

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMACEUTICKEJ BOTANIKY**



**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Antiagregačná aktivita alkaloidov a jej potencionálne využitie v terapii  
Alzheimerovej choroby**

Autor: Adriana Muchová

Vedúci katedry: doc. Ing. Lucia Cahlíková, Ph.D.

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

**CHARLES UNIVERSITY**  
**FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE**  
**DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY**



**DIPLOMA THESIS**

**Antiplatelet activity of alkaloids and its potential use in the  
Alzheimer's disease therapy**

Author: Adriana Muchová

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

Head of Department: doc. Ing. Lucia Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne pod vedením školiteľa. Použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní diplomovej práce čerpala sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

Hradec Králové, 2020

.....

Podpis

## **POĎAKOVANIE**

Touto cestou by som sa rada poďakovala vedúcemu diplomovej práce pánovi PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za odborné vedenie, venovaný čas, priateľský prístup pri konzultáciách a trpezlivosť.

## OBSAH

Zoznam použitých skratiek .....	8
Zoznam použitých obrázkov .....	13
Zoznam použitých tabuliek .....	15
1. ÚVOD .....	16
2. CIEĽ PRÁCE .....	18
3. TEORETICKÁ ČASŤ .....	19
3.1. Hemostáza .....	19
3.1.1. Cievna stena .....	19
3.1.2. Trombocyty .....	21
3.1.2.1. Produkcia krvných doštičiek .....	21
3.1.2.2. Štruktúra krvných doštičiek .....	21
3.1.2.3. Receptory krvných doštičiek .....	23
3.1.2.4. Reakcia krvných doštičiek .....	24
3.1.3. Systém koagulačných faktorov .....	25
3.2. Hemokoagulácia .....	26
3.2.1. Koagulačné faktory .....	26
3.2.2. Prirodzene sa vyskytujúce antikoagulanty v tele .....	28
3.2.3. Štádia krvného zrážania .....	29
3.2.4. Súčasný pohľad na hemostázu .....	31
3.2.4.1. Iniciácia .....	31
3.2.4.2. Amplifikácia .....	32
3.2.4.3. Propagácia .....	32
3.2.5. Regulácia koagulácie .....	33
3.2.6. Patológia hemostázy .....	33
3.2.6.1. Hemoragie .....	33
3.2.6.1.1. Krvácavé stavy v dôsledku poškodenia trombocytov .....	33
3.2.6.1.2. Purpury .....	34
3.2.6.1.3. Koagulopatie .....	35
3.2.6.1.4. Hemoragie z iných príčin .....	35

3.2.6.2.	Trombofílie .....	36
3.3.	Alzheimerova choroba .....	37
3.3.1.	Hemostáza a Alzheimerova choroba .....	39
3.3.1.1.	Krvné doštičky a A $\beta$ -peptid .....	39
3.3.1.2.	Vnútorý koagulačný systém .....	42
3.3.1.3.	Receptor adhézie doštičiek .....	44
3.3.1.4.	Fibrinogén.....	45
3.3.1.5.	Neprilyzín.....	47
3.3.1.6.	Zápal .....	48
3.3.1.7.	Glykogénsyntáza kináza 3- $\beta$ .....	50
3.3.1.8.	Kalpain .....	50
3.3.2.	Farmakoterapia AD .....	51
3.4.	Antiagregancia.....	54
3.4.1.	Kyselina acetylsalicylová .....	54
3.4.2.	Blokátory ADP receptorov .....	55
3.4.3.	Inhibítory glykoproteínových receptorov IIb/IIIa .....	57
3.4.4.	Účinné látky s antiagregačnou aktivitou.....	57
3.5.	Alkaloidy s antiagregačnou aktivitou .....	59
3.5.1.	Alkaloidy odvodené od tyrozínu a fenylalanínu .....	61
3.5.1.1.	Isochinolínové alkaloidy .....	61
3.5.1.1.1.	Aporfínové alkaloidy.....	66
3.5.1.1.2.	Protoberberínové alkaloidy .....	82
3.5.2.	Alkaloidy odvodené od tryptofánu .....	85
3.5.2.1.	Indolové alkaloidy.....	85
3.5.2.1.1.	Pyrolidinoindolínové alkaloidy .....	85
3.5.2.1.2.	$\beta$ -karbolínové alkaloidy .....	87
3.5.2.1.3.	Karbazolové alkaloidy .....	89
3.5.2.1.4.	Indolochinazolínové alkaloidy .....	93
3.5.2.2.	Chinolínové alkaloidy.....	96
3.5.3.	Alkaloidy vznikajúce transaminačnými reakciami – Pseudoalkaloidy .....	104

3.5.3.1.	Steroidné alkaloidy .....	104
3.5.3.2.	Terpénové alkaloidy .....	107
4.	DISKUSIA A ZÁVER .....	109
5.	ABSTRAKT .....	113
6.	ABSTRACT .....	114
7.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	115

## Zoznam použitých skratiek

AA	arachidónová kyselina
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
AC	adenylátcykláza
AD	Alzheimerova choroba
ADP	adenozíndifosfát
ADP-áza	adenozíndifosfatáza
Ach	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
Akt	proteín kináza B
APC	aktivovaný proteín C
ApoE	apolipoproteín E
APP	amyloidný prekurzorový proteín
APS syndróm	antifosfolipidový syndróm
APTT	aktivovaný čiastočný tromboplastínový čas
ASA	kyselina acetylsalicylová
AT III	antitrombín III
ATP	adenozíntrifosfát
ATP-áza	adenozíntrifosfatáza
BACE 1	$\beta$ -sekretáza 1
BBB	hematoencefalická bariéra
BChE	butyrylcholinesteráza
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty



CAA	cerebrálna amyloidná angiopatia
cAMP	cyklický adenosínmonofosfát
cGMP	cyklický guanosínmonofostát
COX	cyklooxygenáza
COX-1	cyklooxygenáza-1
COX-2	cyklooxygenáza-2
CNS	centrálna nervová sústava
EB	endotelové bunky
eNOS	endoteliálna syntéza oxidu dusnatého
ENT-1	equilibratívny nukleozidový transportér
EOAD	skorý nástup Alzheimerovej choroby
EGTA	etylén glycol tetraoctová kyselina
ERK1/2	extracelulárna regulačná proteín kináza 1/2
FDA	správa potravín a liečiv
GIT	gastrointestinálny systém
GMP	guanosínmonofostát
GPIIb/IIIa	glykoproteínové receptory
GSK-3 $\beta$	glykogénsyntáza kináza 3-beta
GTP-áza	guanosíntrifosfatáza
HIF-1 $\alpha$	hypoxiou indukovateľný faktor- 1 $\alpha$
HIV	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti

HK	vysokomolekulárny kininogén
IChE	inhibítory cholinesteráz
IL	interleukín
ICAM-1	intracelulárna adhézna molekula-1
ICAM-2	intracelulárna adhézna molekula-2
IM	infarkt myokardu
KGD	tripeptidová sekvencia lyzín-glycín-aspartát
LOAD	pomalší nástup Alzheimerovej choroby
MAO	monoaminoxidáza
MCI	mierna kognitívna porucha
MK	myozínkináza
MMP- 12	matrixová metallopeptidáza-12
MyD88	myeloidná diferenciačná primárna odpoveď 88
NEP	neprilyzín
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartátový receptor
NO	oxid dusnatý
NSAID	nesteroidné antiflogistikum
P2X, P2Y	purinergné receptory
P38MAPK	mitogénom aktivovaná proteínkináza
PAI-I	inhibitor aktivátora plazminogénu -I
PAF	faktor aktivujúci doštičky
PAR1, PAR4	proteázou aktivovaný receptor

PDGF	doštičkový rastový faktor
PECAM-1	endoteliálna doštičková adhézna molekula-1
PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGH <sub>2</sub>	prostaglandíny I <sub>2</sub> , E <sub>2</sub> , D <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
PI3K	fosfoinozítid 3-kináza
PK	prekalikrein
PKA	proteínkináza A
PKC	proteínkináza C
PLC	fosfolipáza C
PLCG2	fosfolipáza C gamma-2
PMA	forbol myristát acetát
PPAR	peroxizómový proliferčný aktivačný receptor
PT	protrombínový čas
Pyk2	tyrozínová proteínová kináza
RAGE	receptor pre pokročilú glykáciu
Rap1b	RAS príbuzný proteín
RGD sekvencia	tripeptidová sekvencia arginín-glycín-aspartát
RUC-2	rekombinantná ľudská protilátka
SAA	salvianolová kyselina A
scFv	rekombinantná jednoreťazcová protilátka
SPSsyndróm	syndróm lepivých doštičiek
Syk	tyrozín proteín kináza
TAE	totálny alkaloidný extrakt

TAFI	trombínom aktivovateľný inhibítor fibrinolýzy
TF	tkanivový faktor
TFPI	inhibítor cesty tkanivového faktora
TGF- $\beta$	transformujúci rastový faktor
TLR	toll-like receptor
tPA	tkanivový aktivátor plazminogénu
TxA <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
U46619	syntetický analóg prostaglandínu H <sub>2</sub>
VCAM-1	cievna adhézna molekula-1
VEGF	cievny endoteliálny rastový faktor
VEGF-1	cievny endoteliálny rastový faktor-1
vWF	von Willebrandov faktor
WHO	svetová zdravotnícka organizácia
WMH	hyperintenzita bielej hmoty

## Zoznam použitých obrázkov

Obr.1 Cesty sprostredkujúce krvné zrážanie.....	31
Obr.2 Novodobý model aktivácie krvného zrážania .....	32
Obr.3 Patogénne dráhy AD s možným terapeutickým cieľom.....	41
Obr.4 Vnútorný systém zrážania krvi a jej úloha v AD .....	43
Obr.5 Spojitosť medzi aktiváciou krvných doštičiek a tvorbou agregátov A $\beta$ v AD.....	45
Obr.6 Tvorba amyloidných plakov .....	49
Obr.7 Benzylisochinolínová štruktúra alkaloidov.....	62
Obr.8 Fenanthrénová štruktúra alkaloidov .....	63
Obr.9 Štruktúra aporfínového alkaloidu .....	66
Obr.10 Základná štruktúra aporfínových analógov.....	67
Obr.11 Štruktúrna modifikácia aporfínových alkaloidov .....	68
Obr.12 Štruktúry aporfínových alkaloidov .....	69
Obr.13 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny <i>Houttuynia cordata</i> .....	72
Obr.14 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny <i>Annona purpurea</i> .....	75
Obr.15 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny <i>Annona purpurea</i> .....	76
Obr.16 Štruktúra aporfínového alkaloidu rastliny <i>Annona cherimola</i> .....	79
Obr.17 Štruktúra aporfínových alkaloidov .....	80
Obr.18 Štruktúra dehydroaporfínových alkaloidov .....	81
Obr.19 Základná štruktúra protoberberínových alkaloidov .....	82
Obr.20 Štruktúry protoberberínových alkaloidov rastliny <i>Corydalis tashiroi</i> .....	83
Obr.21 Štruktúra pyrolidinoindolínového alkaloidu .....	85
Obr.22 Štruktúra $\beta$ -karbolínových alkaloidov .....	87

Obr.23 Štruktúra karbazolového alkaloidu .....	89
Obr.24 Štruktúry karbazolových alkaloidov rastliny <i>Murraya euchrestifolia</i> .....	91
Obr.25 Štruktúry karbazolových alkaloidov rastliny <i>Clausena excavata</i> . ....	92
Obr.26 Štruktúra indolochinazolínového alkaloidu .....	93
Obr.27 Štruktúra chinolínnového alkaloidu .....	97
Obr.28 Štruktúry chinolínnových alkaloidov rastliny <i>Zanthoxylum simulans</i> .....	99
Obr.29 Štruktúry chinolínnových alkaloidov <i>Zanthoxylum simulans</i> .....	100
Obr.30 Základná štruktúra furochinolínnových alkaloidov .....	102
Obr.31 Štruktúra chinolínnového alkaloidu .....	103
Obr.32 Štruktúry steroidných alkaloidov rastliny <i>Veratrum dahuricum</i> . ....	104
Obr.33 Štruktúra terpénového alkaloidu .....	107

## **Zoznam použitých tabuliek**

Tab.1 Faktory modifikujúce krvné zrážanie .....	20
Tab.2 Doštičkové receptory pre aktiváciu trombocytov .....	23
Tab.3 GP membránové receptory doštičiek.....	24
Tab.4 Nomenklatúra koagulačných faktorov .....	27
Tab.5 Zástupcovia benzylisochinolínových alkaloidov .....	62
Tab.6 Zástupcovia fenanthrénových alkaloidov.....	63
Tab.7 Zástupcovia aporfínových alkaloidov .....	80
Tab.8 Zástupcovia dehydroaporfínových alkaloidov .....	81

# 1. ÚVOD

Alzheimerova choroba je najbežnejšou formou demencie u starších ľudí. Predpokladá sa, že patofyziologický proces Alzheimerovej choroby začína mnoho rokov pred diagnózou demencie. Súčasná farmakologická liečba demencie môže iba mierne zlepšovať príznaky a má len malý úžitok v rámci terapie základných patofyziologických príznakov choroby <sup>1</sup>. Toto ochorenie je náročné nielen pre pacienta ale aj rodinu, ktorá poskytuje pacientovi neustálu opateru. Bolo by skvelé, keby bol k dispozícii liek, ktorý by zabránil vzniku tohto ochorenia no na takýto liek si budeme musieť ešte nejaký čas počkať. Je preto dôležité pacienta včas diagnostikovať a stabilizovať jeho ochorenie hneď na začiatku.

S prevalenciou 1 % populácie je Alzheimerova choroba v rebríčku na štvrtom až piatom mieste príčinou úmrtia. Výskyt Alzheimerovej choroby stúpa spolu s vekom. Medzi 64 a 74 rokov je týmto ochorením postihnutá 3 % populácie, medzi 75 a 84 rokov dosahuje k 19 % a po 85 roku postihuje 47 % populácie. Podľa štúdie svetovej zdravotníckej organizácie z roku 2016 sa predpokladá, že nárast pacientov s Alzheimerovou chorobou sa v roku 2050 strojnásobí na cca 135,5 miliónov <sup>2</sup>.

Krvné doštičky sú hlavnými hráčmi v hemostáze ale podieľajú sa aj na neuro-inflamačných ochoreniach ako je Alzheimerova choroba. Po mnoho rokov sú krvné doštičky akceptované ako periférny model pri štúdiu patofyziológie Alzheimerovej choroby, pretože krvné doštičky vykazujú všetky enzymatické aktivity na tvorbu amyloidných  $\beta$ -peptidov <sup>3</sup>. Zároveň sú dôležitým periférnym zdrojom amyloidného prekursorového proteínu, pretože tvoria viac ako 90 % celkového množstva amyloidného prekursorového proteínu v obehovom systéme kde sa zdá, že sa zúčastňuje na procese zrážania krvi <sup>1</sup>. Nehemostatická úloha, ktorú hrajú doštičky je do značnej miery spôsobená ich schopnosťou priľnúť k rôznym typom buniek v spojení so skutočnosťou, že obsahujú viac ako 300 proteínov a sú bohatým zdrojom prozápalových cytokínov a chemokínov. Zapojenie doštičiek do patogenézy Alzheimerovej choroby otvára vysoko atraktívnu možnosť aplikácie protidoštičkovej terapie na liečenie či prevenciu Alzheimerovej choroby <sup>4</sup>.

Univerzita Karlova sa taktiež podieľa na výskume Alzheimerovej choroby. Na katedre farmaceutickej botaniky na farmaceutickej fakulte v Hradci Králové sa vedecká skupina



ADINACO zaoberá prírodnými látkami a ich aktivitou vzťahujúcou sa k AD <sup>5</sup>. Vo svojej práci súhrne spracovávam alkaloidy vybraných štruktúr, ktorý majú potenciál inhibovať agregáciu krvných doštičiek.

## **2. CIEĽ PRÁCE**

Cieľom mojej práce bolo sumárne spracovať určité štruktúrne typy alkaloidov s čo najväčším možným potenciálom inhibovať agregáciu krvných doštičiek a využiť tak tento efekt v potencionalnej terapii. Pri jednotlivých typoch alkaloidov som sa snažila uviesť možné mechanizmy účinku a vzťah medzi chemickou štruktúrou alkaloidov a ich účinkom. Zároveň bolo mojim cieľom priblížiť problematiku hemostázy v spojitosti s Alzheimerovou chorobou a definovať nové možné terapeutické ciele v terapii tohto ochorenia, ktoré som čerpala z odbornej literatúry za posledné desaťročie.

### 3. TEORETICKÁ ČASŤ

#### 3.1. Hemostáza

Zástava krvácania je zložitým dejom pri ktorom sa organizmus snaží zamedziť strate krvi a to obnovením celistvosti cievnej steny. Neodmysliteľnými zložkami hemostázy sú trombocyty, cievna stena a súbor plazmatických proteínov ako sú inhibítory zrážania krvi, prokoagulačné faktory a zložky procesu rozpúšťania krvnej zrazeniny. Za fyziologických podmienok sú tieto zložky v rovnováhe, no pokiaľ je rovnováha porušená môže dôjsť až k trombóze či naopak chorobnému krvácaniu <sup>6</sup>.

Primárna hemostáza sa spája so zahájením a formáciou doštičkovej zátky. Ak dôjde k poraneniu, krvné cievy sa v poranenom mieste zúžia v priebehu niekoľkých sekúnd až minút a priťahujú cirkulujúce krvné doštičky čím sa podporí ich adhézia k subendotelu. Von Willebrandov faktor (vWF) zvyšuje súdržnosť doštičiek. Povrchové fosfolipidy krvných doštičiek poskytujú povrch pre faktorové komplexy. Doštičky a proteín vWF spolupracujú a vytvárajú voľnú zátku v poškodenej cieve <sup>7</sup>.

##### 3.1.1. Cievna stena

Všetky cievy okrem vlásočníc sa skladajú z 3 vrstiev. Najvnútornejšia endotelová vrstva (tunica intima), svalová vrstva (tunica media) a vonkajší väzivový obal (tunica adventicia). Vnútoraná vrstva je tvorená endotelovými bunkami (EB). Jej základnými zložkami sú fibroblasty a hladké svalové bunky <sup>8</sup>. EB plnia aj funkciu inhibície aktivácie trombocytov a to prostredníctvom <sup>6</sup>:

1. záporne nabitých povrchov EB, ktoré odpudzujú elektronegatívne krvné doštičky.
2. tvorbou enzýmu adenozíndifosfatázy (ADP-áza) štiepiaceho adenozíndifosfát (ADP).
3. produkciou NO prostredníctvom aktivácie cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP), čo sa prejaví dilatáciou ciev a protidoštičkovým účinkom.
4. syntézou prostaglandínového metabolitu PGI<sub>2</sub> s antiagregačným účinkom.

Produktom EB je heparan sulfát, ktorý inhibuje činnosť trombínu cez aktiváciu antitrombínu a urýchľuje spomalenie činnosti koagulačných faktorov Xa. Ďalším produktom EB je trombomodulín viažuci trombín, ktorý brzdí rozklad fibrinogénu a spomaľuje tým aktivačné účinky trombínu. Trombomodulín prostredníctvom trombínu zvyšuje schopnosť aktivácie proteínu C, ktorý je zásadný v spomalení krvnej zrážanlivosti. Produktom EB je tiež inhibítor krvného zrážania antitrombín <sup>6</sup>.

Pri poranení ciev dochádza k reflexnému zúženiu ciev za účelom zníženia straty krvi. Pre zvýšenie svalového tonu sú dôležité mediátori ako serotonín, adrenalín a noradrenalín. Na riadení vazokonstrikcie sa realizuje systém renín/angiotenzín a NO. Pri poškodení väčších ciev samotná vazokonstrikcia nestačí. Musia sa uplatniť mechanizmy primárnej a sekundárnej hemostázy. Endotel je producentom vWF a tkanivového faktora (TF), ktoré plnia hemostatickú funkciu. Medzi látky podporujúce krvnú zrážanlivosť cez svoje antifibrinolytické účinky patrí trombínom aktivovateľný inhibítor fibrinolýzy (TAFI) a inhibítor aktivátora plazminogénu -I (PAI-I) <sup>6</sup>.

**Tab.1 Faktory modifikujúce krvné zrážanie <sup>8</sup>**

Inhibícia krvného zrážania	Iniciácia krvného zrážania
inhibítor cesty tkanivového faktora	tkanivový faktor
vWF-proteáza metabolizujúca VWF	vWF
inhibítor aktivátoru plazminogénu 1	tkanivový aktivátor plazminogénu
Prostacyklin PGI <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
Oxid dusnatý	faktor aktivujúci doštičky
Trombomodulín	trombínový receptor PAR
Glykosaminoglykany (heparansulfát)	heparinázy
pokles jednotlivých molekúl	selektiny, cytoadhezívne molekuly,
antagonisti, inhibičné cytokíny	cytokíny

Pri zápalových reakciách organizmu sú endotelom produkované cytokíny ako chemokíny, IL-8 uvoľňované po aktivácii T-buniek. Na povrchu EB ciev sa vyskytujú integríny ako adhézne receptory, ktoré zaisťujú väzbu s kolagénom, fibronektínom. P-selektín a E-selektín sa účastnia bunkovej adhézie bielych krviniek na krvné doštičky. Bunečné adhézne molekuly ICAM-1, ICAM-2 a cieвне adhézne molekuly VCAM-1, sú dôležité pri zápalových reakciách v tele a imunitných odpovediach. Plnia funkciu receptorov pre integríny bielych krviniek a adhézných molekúl PECAM-1, ktoré sa podieľajú na celistvosti cieвnej steny a prieniku bielych krviniek. V neposlednom rade exprimujú dôležitými receptormi pre rastové faktory potrebné pre novotvorbu ciev ako sú angiopoetíny, cieвне endotelové rastové faktory (VEGF-R1 a VEGF-1), doštičkový rastový faktor (PDGF) <sup>6</sup>.

### **3.1.2. Trombocyty**

#### **3.1.2.1. Produkcia krvných doštičiek**

Krvné doštičky sa tvoria v kostnej dreni a to odštepovaním bunkovej plazmy zrelých megakaryocytov. Vývojová línia krvných doštičiek: kmeňová bunka → promegakaryoblast → megakaryoblast → promegakaryocyt → zrelé a nezrelé megakaryocyty. Megakaryocyty sú veľké bunky o veľkosti 8-32 jadri, ktoré vznikajú opätovným delením jadri bez delenia bunky. Medzi hlavné rastové molekuly podporujúce rast, vznik a vývoj krvných doštičiek je trombopoetín. Má dôležitú úlohu v novotvorbe buniek, diferenciácii buniek CD34+, zdvojení DNA a vyzrievaní cytoplazmy megakaryocytov. Na týchto dejoch sa uplatňujú hormóny aj cytokíny <sup>8</sup>.

#### **3.1.2.2. Štruktúra krvných doštičiek**

Krvné doštičky majú dĺžku života približne 8 – 12 dní . Fyziologický počet krvných doštičiek je 150–450 x 10<sup>9</sup>/l krvi. V závislosti od stupňa aktivácie trombocytov sa mení aj tvar krvných doštičiek. Diskovitý tvar pretrváva v pokojovom štádiu a pozostáva z 3 hlavných častí <sup>6</sup>:

A. Membrána trombocytov má v sebe zakomponované receptory a zároveň sa podieľa aj na vzájomných interakciách medzi vonkajším a vnútorným prostredím bunky. Bunkový plášť nachádzajúci sa na povrchu membrány má záporný náboj a pôsobí odpudivo voči cieвnej stene a iným zložkám krvi <sup>6</sup>. Skladá sa z glykolipidov a glykoproteínov, ktoré sú aj

súčasťou receptorov pre aktivátory doštičiek (ADP, epinefrín, kolagén, trombín, serotonín,  $\text{TxA}_2$ ) a inhibítorov zrážania krvi ( $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ). Membrána pozostáva z lipidovej dvojvrstvy a proteínov. Fosfolipidy sú rozložené nerovnomerne v kľudovom stave. Fosfatidylcholín a sfingomyelín sú orientované na povrch a tvoria neutrálny náboj zatiaľ čo fosfatidylserín a fosfatidyletanolamín tvoria elektronegatívny náboj smerujúci do vnútra. Po aktivácii sa dostávajú na vonkajšiu stranu membrány kde sa zhromažďujú aktivované koagulačné faktory <sup>6</sup>.

B. Cytoskelet pozostáva z mikrotubulov, ktoré zabezpečujú diskovitý tvar krvných doštičiek a sú kruhovo usporiadané pod membránou bunky. Ich základnou stavebnou zložkou je tubulín. Základnými zložkami mikrofilamentov sú aktín a myozín. Vytvorením komplexu aktín-myozín dochádza ku zmršťovaniu mikrofilamentov, čo má za následok zmenu tvaru trombocytov na guľovitý a tvorbu výbežkov cytoplazmy. Tubulárny systém slúži najmä ako sklad vápnika a miesto pre syntézu prostaglandínov. Obsahujú tiež dôležité enzýmy ako cyklooxygenázu (COX) a adenosíntrifosfatázu (ATP-áza) <sup>6</sup>.

C. Doštičkové granuly delíme na základe odlišnej funkcie a obsahu do 4 skupín . Prvou skupinou sú  $\alpha$ -granuly v približnom množstve 10–15. Obsahom  $\alpha$ -granúl sú molekuly, ktoré plnia aj adhezívnu funkciu (trombospondín, fibronektín, vWF) ale aj prokoagulačné látky (doštičkový faktor 4,  $\beta$ -tromboglobulín, fibrinogén, FV) inhibítory proteáz ( $\alpha$ 1-antitrypsín a  $\alpha$ 2-makroglobulín), rastové faktory (PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF) a faktory fibrinolýzy (plazminogén, PAI-I,  $\alpha$ 2-anti-plazmín). Ďalšie molekuly ako albumín a imunoglobulíny. Na membráne tejto skupiny granúl sa nachádzajú aj špecifické receptorové glykoproteíny ako GP1b/IX/V, GPIIb/IIIa, adhezívne molekuly PECAM-1 a pre  $\alpha$ -granuly typický selektín P. Druhou skupinou granúl sú  $\delta$ -granuly s obsahom malých molekúl ako serotonín, katecholamíny, ADP, adenosíntrifosfát (ATP). Nazývame ich aj husté telieska. V doštičkách sa vyskytujú v počte od 2 do 8 granúl.  $\delta$ -granuly uvoľňujú svoj obsah po aktivácii trombocytov. Treťou skupinou granúl sú lyzozómy s enzymaticky pôsobiacimi molekulami ako kyslá fosfatáza,  $\beta$ -glukuronidáza, arylsulfatáza sú dôležité pri aktivácii trombocytov. Poslednou skupinou granúl sú peroxizómy <sup>6</sup>.

### 3.1.2.3. Receptory krvných doštičiek

Doštičkové receptory pre ADP delíme na P2X a P2Y. Aktivovaný P2X receptor umožňuje vstup vápnika a zmenu tvaru doštičiek, ale neumožňuje ich aktiváciu čo by malo za následok agregáciu doštičiek. Dôležitými receptormi pre indukciu agregácie sú P2Y<sub>1</sub> a P2Y<sub>12</sub>. P2Y<sub>1</sub> má za úlohu mobilizovať obsah vápnika v bunke a prispievať tak ku zmene tvaru doštičiek. Receptor P2Y<sub>12</sub> inhibuje enzým adenylátcyklázu, znižuje hladinu cAMP, podporuje produkciu tromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) a aktivuje receptory GPIIb/IIIa<sup>9</sup>.

Receptory pre trombín sú aktivované proteázami a na ľudských trombocytoch sa vyskytujú 2 typy: PAR1 a PAR4. Po ich aktivácii dochádza k preneseniu signálov a opäť k aktivácii GPIIb/IIIa, mobilizácii P-selektínu a uvoľneniu fosfolipázy A2<sup>9</sup>.

Receptory pre prostaglandíny (IP,EP,DP) stimulujú enzým adenylátcyklázu tým narastá cAMP čo naopak agregáciu doštičiek spomaľuje. Medzi prostaglandínové receptory patria aj TP receptory pre TxA<sub>2</sub>. Aktivuje fosfolipázu C čo má za následok uvoľňovanie, aktiváciu a agregáciu doštičiek<sup>9</sup>.

Glykoproteínové receptory môžeme nájsť zakotvené v membráne fosfolipidov doštičiek, v systéme kanálikov a na membráne  $\alpha$ -granúl. Glykoproteínový komplex Ib/IX/V po naviazaní vWF a trombínu plní adhezívne vlastnosti, na ktorých sa podieľa aj sieť aktínu, s ktorým je tento komplex spojený. Receptor GP IIb/IIIa je rozhodujúci pri zrážanlivosti krvných doštičiek a to tým, že viaže fibrinogén. Pre adrenalín, serotonín vazopresín existujú taktiež typické membránové receptory<sup>9</sup>.

**Tab.2 Doštičkové receptory pre aktiváciu trombocytov<sup>6</sup>**

Receptor	Agonista	Metabolický účinok	Konečný účinok
IP,DP,EP-rec.	PG-I2,D2,E2	↑ adenylátcykláza	↑cAMP, inhibícia zrážania krvi
P2X	ADP	↑ Ca <sup>2+</sup> , myozínkináza	Zmena tvaru
P2Y1		↑ Ca <sup>2+</sup> , myozínkináza	Zmena tvaru, aktivácia GPIIb/IIIa,
P2Y12		TxA <sub>2</sub> , adenylátcykláza	Sekrécia, agregácia, aktivácia GPIIb/IIIa

**Tab.2 Doštičkové receptory pre aktiváciu trombocytov (pokračovanie)<sup>6</sup>**

PAR-1, PAR-4	Trombín	fosfolipáza C, myozínkináza, adenylátcykláza	Zmena tvaru, sekrécia, aktivácia GPIIb/IIIa, agregácia
TP- rec.	TxA <sub>2</sub>	fosfolipáza C	Sekrécia, aktivácia GPIIb/IIIa, agregácia

**Tab.3 GP membránové receptory doštičiek <sup>6</sup>**

Membránový receptor	Väzba	Funkcia
GPIb/IX/V	vWF, trombín	Adhézia
GPIIb/IIIa	fibrinogén, vitronektín, vWF	Agregácia
GPVI	kolagén	Aktivácia a agregácia
GPIV	kolagén II, trombospondín	Adhézia a intracelulárny prenos signálov
GPIa/IIa	kolagén	Sekrécia, aktivácia, agregácia
GPIc/IIa	laminín	Adhézia

### 3.1.2.4. Reakcia krvných doštičiek

Primárna hemostáza spočíva v adhézii krvných doštičiek, aktivácii a agregácii, interakcii medzi endotelom, plazmatickými proteínmi a krvnými doštičkami <sup>6</sup>.

V procese adhézie sa trombocyty dostanú do kontaktu s povrchom endotelu. K tejto interakcii môže dôjsť s neporušeným (aktivovaným) aj poškodeným endotelom. Viazanie trombocytov na exponované trombogénne povrchy nastáva, keď glykoproteín Ib doštičiek sa viaže na vWF. vWF je veľký multimerný adhezívny proteín, ktorý sa viaže na kolagén a spôsobí konformačnú zmenu. Avšak táto počiatočná väzba nie je stabilná. Začnú sa aktivovať doštičky, receptor GPIIb/IIIa spôsobí konformačné zmeny, čím umožní synergické viazanie medzi GPIIb/IIIa a fibrinogénom, čo vedie k pevnejšej a trvalejšej väzbe. Adhézia je navyše podporovaná aj interakciou kolagénu s GPIa/IIa <sup>9</sup>. Krvné doštičky sa aktivujú, keď postupne



prilnú k EB. To tiež vedie v aktivácii EB a expresii/sekrécii chemokínov. Výsledkom aktivácie je výrazná štrukturálna zmena kedy sa krvné doštičky stávajú sférickými so pseudopódiami. Expozícia negatívne nabitých doštičkových fosfolipidov a receptorov pre špecifické zrážacie faktory pochádzajúce z  $\alpha$ -granúl doštičiek, poskytujú prokoagulačný povrch na zostavenie komplexu enzýmov koagulačnej dráhy. Aktivácia doštičiek je spôsobená väzbou rôznych agonistov (trombín,  $\text{TxA}_2$ , ADP, kolagén, kyselina arachidónová (AA)). Naopak zvýšené koncentrácie cAMP inhibujú adhéziu doštičiek ich agregáciu a uvoľňovanie. Po aktivácii krvných doštičiek je aktivita adenylátcyklázy znížená, znižuje sa koncentrácia cAMP a zvyšuje sa mobilizácia vápnika. Nasleduje mnoho vápnikovo závislých reakcií vrátane fosforylácie ľahkého reťazca myozínu, sekrécie obsahu krvných doštičiek a uvoľnenie AA. Tieto udalosti sú modulované niekoľkými regulačnými látkami produkovanými samotnými krvnými doštičkami a tiež EB. Keď sa krvné doštičky aktivujú, adherujú k nim aj ďalšie doštičky. Tento proces sa nazýva agregácia a je sprostredkovaný fibrinogénom, ktorý sa viaže na GPIIb-IIIa na aktivovaných krvných doštičkách v dôsledku čoho, dochádza k zachytávaniu ostatných trombocytov. Tieto nové trombocyty sa postupne aktivujú a uvoľňujú granule pre ďalšie pokračovanie agregáčného procesu <sup>9</sup>.

### **3.1.3. Systém koagulačných faktorov**

Zaraďujeme ich spolu s inhibítormi krvného zrážania a faktory fibrinolýzy medzi plazmatické faktory <sup>8</sup>. Práve pri poškodení väčších ciev sú veľmi dôležité. Pôsobia ako enzýmy, ktoré v krvi kolujú v neaktívnej forme a ako kofaktory teda látky urýchľujúce enzymatické reakcie krvného zrážania <sup>6</sup>. Viac o hemokoagulačných faktoroch a fyziológii hemokoagulácie rozoberiem v nasledujúcej kapitole.

### 3.2. Hemokoagulácia

Koagulačný proces = sekundárna hemostáza je pod kontrolou niekoľkých inhibítorov, ktoré obmedzujú tvorbu zrazeniny, čím sa zabráni množeniu trombu. Táto rovnováha sa preruší vždy, keď sa zvýši prokoagulačná aktivita koagulačných faktorov alebo sa zníži aktivita prirodzene sa vyskytujúcich inhibítorov koagulácie <sup>7</sup>.

#### 3.2.1. Koagulačné faktory

Väčšina faktorov zrážania sú prekursor proteolytických enzýmov známych ako zymogény, ktoré cirkulujú v neaktívnej forme. Aktivácia každého zymogénu je vyjadrená príponou „a“ k rímskej číslici označujúcej konkrétny zymogén. Väčšina prokoagulantov a antikoagulantov sa tvorí v pečeni s výnimkou faktora III, IV a VIII. Tieto proteíny podliehajú určitej úprave, ktorá im umožňuje viazať vápnik a ďalšie dvojmocné kationy a zúčastňovať sa na agregáčnych procesoch. Protrombín je plazmatický proteín tvorený v pečeni. Je to nestabilný proteín, ktorý sa rozdeľuje na menšie proteíny, z ktorých jeden je trombín. Trombín generovaný z protrombínu má tiež prozápalové účinky, ktoré sa prejavujú aktiváciou proteázy receptorov prítomných na monocytoch, lymfocytoch, endotelu a dendritických bunkách. vWF je glykoproteín prítomný v krvnej plazme a produkovaný endotelom, megakaryocyty a subendoteliálnym spojivovým tkanivom. Sprostredkováva adhéziu krvných doštičiek na subendoteliálny povrch. Pôsobí tiež ako nosičový proteín pre koagulačnú aktivitu faktora VIII. Fibrinogén je nevyhnutný koagulačný proteín produkovaný v pečeni a je prekursorom fibrínu. Faktor III alebo TF je prokoagulačný glykoproteín viazaný na membránu, prítomný v subendotelovom tkanive a fibroblastoch a nie je vystavený krvi až do narušenia steny ciev. Je primárnym iniciátorom koagulácie *in vivo*. Tkanivový faktor môže byť aktivovaný fyzickým poškodením (aktivácia cievnej steny TF), priamym poškodením ciev alebo funkčným poškodením (aktivácia cirkulujúceho TF), hypoxiou, sepsou, malignitou, zápalom. Hypoxia nadreguluje expresiu P-selektínu prítomného v  $\alpha$ -granulách krvných doštičiek na endoteli, ktorý vedie k získaniu monocytov obsahujúcich TF, čím sa iniciuje koagulácia. Pri expozícii TF s faktormi VII/VIIIa v krvi sa umožňuje tvorba komplexu TF-VIIIa, a tým sa iniciuje koagulačná kaskáda <sup>8</sup>.

**Tab.4 Nomenklatúra koagulačných faktorov** <sup>10</sup>

Číslo	Názov faktora	Funkcia/aktivuje
FI	Fibrinogén	Krvné koagulum, aktivácia trombocytov
FII	Protrombín	Aktivátor FI, V, VII, VIII, XI, XIII, proteínu C, trombocytov
FIII	TF- tkanivový faktor	Kofaktor pri aktivácii FIIa
FIV	Vápnik	Uľahčuje väzbu koagulačného faktora na fosfolipidy
FV	Proakcelerín	Kofaktor protrombinázového komplexu X
FVII	Prokonvertín	Aktivuje faktory IX, X
FVIII	Antihemofilický faktor A	Kofaktor tenázového komplexu IX
FIX	Christmasov faktor	Aktivuje faktor X
FX	Stuart-Powerov faktor	Protrombinázový komplex s faktorom V: aktivuje faktor II
FXI	Antihemofilický faktor C	Aktivuje faktor IX
FXII	Hagemanov faktor	Aktivuje faktory XI, VII a prekalikrein
FXIII	Fibrin-stabilizujúci faktor	Zosieťuje fibrín
FXIV	Prekalikrein	Zymogénová serínová proteáza
FXV	HMWK	Kofaktor
FXVI	von Willebrandov faktor	Viaže sa k faktoru VIII, sprostredkuje adhéziu doštičiek

**Tab.4 Nomenklatúra koagulačných faktorov (pokračovanie) <sup>10</sup>**

FXVII	Antitrombin III	Inhibuje IIa, Xa, a iné proteázy
FXVIII	Heparin kofaktor II	Inhibuje IIa
FXIV	Protein C	Inaktivuje Va a VIIIa
FXX	Protein S	Kofaktor pre aktivovaný proteín C

### 3.2.2. Prirodzene sa vyskytujúce antikoagulanty v tele

Antikoagulačný systém má regulačnú úlohu nad prokoagulačnou aktivitou v krvi, čím lokalizuje tvorbu trombu. Uvedieme si hlavné antikoagulačné mechanizmy, ktoré sa prirodzene vyskytujú v tele. Antitrombín (AT) je inhibítor serínovej proteázy, ktorý viaže a deaktivuje trombín a faktory IXa, Xa, XIa a XIIa. Enzymatická aktivita AT je zvýšená v prítomnosti heparínu. AT sa aktivuje väzbou heparín sulfátu prítomného na povrchu EB. AT viaže koagulačné faktory a tento komplex je odstránený retikuloendotelovými bunkami. Inými inhibítormi trombínu sú heparínový kofaktor II,  $\alpha$ 2-makroglobulín a  $\alpha$ 1-antitrypsín <sup>6</sup>.

Ďalším významným antikoagulantom je inhibítor tkanivového faktora plazminogénu. Pôsobí ako prírodný inhibítor vonkajšej dráhy inhibíciou komplexu TF-VIIa. Proteín C je serínová proteáza so silnými antikoagulačnými, profibrinolytickými a protizápalovými vlastnosťami. Aktivuje sa trombínom a vytvára aktivovaný proteín C (APC). Pôsobí tak, že inhibuje aktivované faktory V a VIII (s proteínom S a fosfolipidmi pôsobiacimi ako kofaktory). Trombomodulín je transmembránový receptor na endoteliálnych bunkách, ktorý zabraňuje tvorbe zrazeniny v nepoškodenom endoteli väzbou na trombín. Receptor C endoteliálneho proteínu je ďalším transmembránovým receptorom, ktorý pomáha pri aktivácii proteínu C. Proteín S je glykoproteín závislý od vitamínu K, syntetizovaný EB a hepatocyty. Existuje v plazme ako voľná (40 %) tak aj viazaná (60 %) forma. Antikoagulačná aktivita je na základe voľnej formy, zatiaľ čo viazaná forma pôsobí ako inhibítor komplementového systému. Je regulovaná v zápalových procesoch, ktoré znižujú hladinu proteínu S, čo vedie k prokoagulačnému stavu. Funguje ako kofaktor APC pri inaktivácii FVa a FVIIIa <sup>10</sup>.

Spôsobuje priamu reverzibilnú inhibíciu protrombinázového (FVa – FXa) komplexu. Proteín Z závislý inhibítor proteázy je nedávno opísaná zložka antikoagulačného systému, ktorá sa vytvára v pečeni. Inhibuje faktor Xa pri reakcii vyžadujúcej proteín Z a vápnik <sup>10</sup>.

### 3.2.3. Štádia krvného zrážania

Posledné štádium zrážania krvi, premena fibrinogénu na fibrín, je katalyzovaná proteázou nazývanou trombín (alebo faktor IIa), ktorá je výsledkom aktivácie prekursora protrombínu (alebo faktora II) proteolýzou, ktorá je katalyzovaná faktorom Xa <sup>6</sup>. Celý proces je možné rozdeliť na tri etapy: prvá etapa vedie k aktivácii faktora Xa, druhá obsahuje aktiváciu trombínu a tretia produkciu fibrínu <sup>11</sup>.

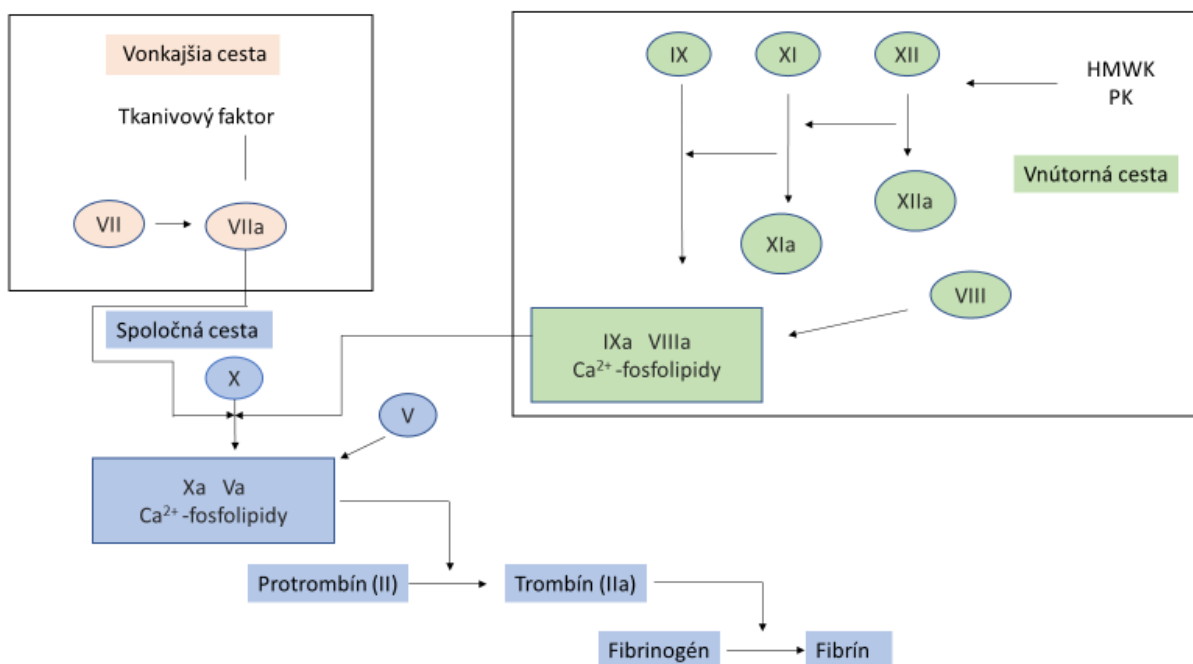
1. Formácia faktora Xa cestou vnútornej koagulačnej dráhy <sup>11</sup>. K zahájeniu koagulácie môže dôjsť keď krv príde do kontaktu s negatívne nabitým povrchom (poškodenie endotelu, mimotelový obeh, sklo). Endotel sa môže za patologických aj fyziologických podmienok zmeniť na vysoko aktívny agens <sup>12</sup>. Faktory, ktoré sú zapojené do tohto procesu sú prekallikrein, kininogén, Hagemanov faktor (XII) a plazmatický predchodca tromboplastínu. Faktor XII katalyzuje premenu prekallikreínu na kalikreín. Aktivita tejto proteázy je potenciovaná kininogénom a obidva aktivujú faktor XII. Aktívna proteáza XII (XIIa) prevádza plazmatický tromboplastín (XI) na aktívny faktor XIa. Tento krok nevyžaduje  $\text{Ca}^{2+}$  ióny. Faktor IXa v prítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iónov katalyzuje hydrolýzu peptidovej väzby vo faktore IX, čím sa aktivuje. Faktory IXa, X a VIII prostredníctvom interakcie s ich  $\gamma$ -karboxyglutamátovými zvyškami s fosfolipidmi, viažu a tvoria komplex na plazmatickej membráne krvných doštičiek. Faktory IXa a X sú prvé faktory, ktoré sú v kontakte s doštičkami, potom je pripojený faktor VIII. Faktor VIII funguje ako kofaktor pre aktiváciu faktora X. Takto vytvorený komplex IXa – X – VIII sa nazýva vnútorná tenáza. Faktor VIII sa v plazme združuje s vWF <sup>11</sup>.

Formácia faktora Xa prostredníctvom vonkajšej koagulačnej dráhy. Pri kontakte krvi s poškodeným tkanivom, sa faktor Xa rýchlo generuje. Mechanizmus aktivácie faktora X prostredníctvom tejto cesty spočíva vo vytvorení komplexu za pomoci faktora VII,  $\text{Ca}^{2+}$  a tkanivového faktora (tromboplastín alebo faktor III). Tkanivový faktor je lipoproteín, prítomný vo všetkých tkanivách s najväčším obsadením v pľúcach, mozgu a placentе <sup>11</sup>. Faktor VII je aktivovaný jeho asociáciou s fosfolipidovou doménou TF, prostredníctvom

γ-karboxyglutamátových zvyškov. Komplex vytvorený z FVIIa – TF –  $\text{Ca}^{2+}$  tiež nazývame ako vonkajšia tenáza. Prevádza faktor X na aktívny faktor Xa. Vonkajšia cesta koagulácie začína už behom niekoľkých sekúnd, zatiaľ čo vnútornej koagulačnej ceste to trvá pár minút. Obe dráhy sa zbiehajú pri tvorbe faktora Xa. Nasledujúce fázy sú spoločné pre obidve dráhy <sup>11</sup>.

2. Proteáza α-trombín (FIIa) sa vytvára hydrolýzou zymogénneho protrombínu (FII), čo je glykoproteín s 582 aminokyselinami. Premena protrombínu na α-trombín je katalyzovaná FXa v reakcii, ktorá je zosilnená komplexom s proakcelerínom (FV), fosfolipidmi doštičiek, membrány a  $\text{Ca}^{2+}$  (protrombinázový komplex). Faktor Xa a protrombín sa viažu na fosfolipidy za pomoci γ-karboxyglutamátových zvyškov a  $\text{Ca}^{2+}$ . Faktor V je aktivovaný pomocou α-trombínu na akcelerín (FVa). Faktor Va urýchľuje proteolýzu protrombínu katalyzovanú Xa <sup>11</sup>.

3. Fibrinogén je glykoproteín zložený zo šiestich polypeptidových reťazcov (dva Aα, dva Bβ a dva γ) spojené disulfidovými väzbami. Reťazce sú ovinuté okolo pozdĺžnej osi a tvoria trojitú špirálu. Voľné konce v strednej zóne molekuly sa skladajú z A a B častí (Aα a Bβ), bohaté na aspartát a zvyšky glutamátu. Konce Bβ obsahujú tyrozín-O-sulfátové zvyšky. Tieto skupiny prispievajú k poskytnutiu elektronegatívnej oblasti v strednej časti molekuly a sú zodpovedné za vzájomné odpudzovanie rôznych molekúl fibrinogénu. α-Trombín hydrolyzuje arginyl-glycín väzby na voľných N-terminálnych segmentoch Aα a Bβ reťazcoch, oddeľujúcich 4 peptidy z 18 aminokyselín. Tieto peptidy sú fibrinopeptidy. Zvýškom molekuly fibrínu je monomér  $(\alpha\gamma)_2$ . S odstránením fibrinopeptidov bohatých na elektronegatívne skupiny, fibrín stráca svoj intramolekulárny odpor. Monoméry majú sklon k polymerizácii a spontánne a vysoko vytvárajú usporiadané molekulárne asociácie. Fibrínové zväzky tvoria voľnú sieť a nemôžu tvoriť stabilnú zrazeninu pokiaľ nie sú zosilnené pridaním kovalentných väzieb medzi vláknami. Tieto väzby sú tvorené transamidázou (faktor XIIIa alebo transglutamináza), tvorenou z faktora XIII α-trombínom. Transglutamináza katalyzuje tvorbu amidickej väzby medzi fibrínovými monomérmi glutamínu a lyzínovými zvyškami v susedných vláknach <sup>11</sup>.



**Obr.1 Cesty sprostredkujúce krvné zrážanie** <sup>13</sup>

### 3.2.4. Súčasný pohľad na hemostázu

V posledných rokoch bol opísaný modifikovaný model založený na bunkách, ktorý presnejšie odráža udalosti hemostázy. Teória kaskády naznačuje, že tvorba zrazenín môže nastať v dôsledku dvoch nezávislých dráh. Teraz je známe, že interakcia medzi faktorom VII (FVII) a tkanivovým faktorom (TF) je iniciátorom všetkých koagulačných procesov (prírodných aj patologických). Komplex tvorený TF a faktorom VII sa tiež podieľa na aktivácii faktora IX (ako aj faktora X), čo znamená krížovú aktiváciu vnútornej dráhy vonkajším systémom. Koagulácia má tri po sebe nasledujúce fázy – iniciácia, amplifikácia a propagácia. Doštičky a trombín sa aktívne podieľajú na posledných dvoch fázach <sup>6</sup>.

### 3.2.4.1. Iniciácia

Vystavenie krvi bunkám exprimujúcim TF vedie k iniciácii koagulácie krvi. TF je bunkovo viazaný transmembránový glykoproteín a je členom cytokínovej rodiny triedy II. Je exprimovaný na biologických povrchoch. To zaisťuje, že po narušení vaskulárnej integrity je krv okamžite vystavená TF a je zahájená koagulácia <sup>13</sup>. TF tvorí komplex s faktorom VIIa na

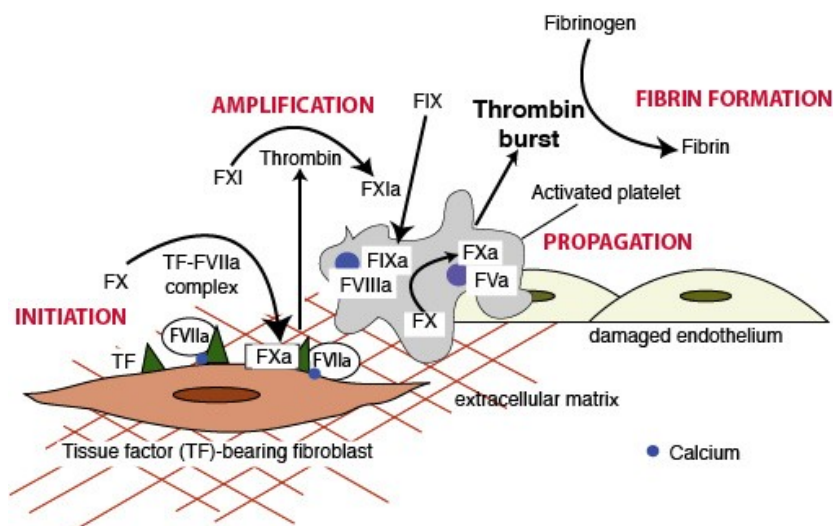
fosfolipidovom povrchu bunkovej membrány, ktorý potom aktivuje zymogénny faktor IX a faktor X. Aktivovaný faktor X (FXa) potom vytvára malé množstvo trombínu <sup>13</sup>.

### 3.2.4.2. Amplifikácia

Hladiny trombínu generovaného z iniciačnej fázy sú zvyčajne nedostatočné pre tvorbu fibrínu. Hlavnou funkciou trombínu je však aktivácia faktorov V, VIII a XI. Vo fáze amplifikácie faktor XIa aktivuje faktor IX, ktorý tvorí komplex s faktorom VIIIa. Tento komplex („tenáza“) aktivuje dostatočné množstvo faktoru Xa na vytvorenie komplexu s faktorom Va, ktorý sa nazýva protrombinázový komplex. Tvorba komplexu vedie k uvoľneniu veľkého množstva trombínu, ktorý nakoniec vedie k tvorbe fibrínovej zrazeniny <sup>13</sup>.

### 3.2.4.3. Propagácia

Propagačná fáza závisí od zhromaždenia aktivovaných krvných doštičiek v mieste zranenia. Doštičky poskytujú fosfolipidový povrch, ktorý umožňuje lokalizáciu aktivovaných koagulačných zložiek pre optimálne vytvorenie trombínu. Tieto komponenty zahŕňajú vnútorný komplex tenázy, komplex protrombinázy a vápnik. Tvorba trombínu spôsobená týmito komplexmi vedie k tvorbe fibrínu z fibrinogénu za vzniku stabilnej fibrínovej zrazeniny. Trombín tiež aktivuje faktor XIII, ktorý posilňuje fibrínové sieťovacie a trombínmi aktivovateľné inhibítory fibrinolýzy, ktoré chránia zrazeninu pred fibrinolýzou sprostredkovanou plazmínmi <sup>13</sup>.



Obr.2 Novodobý model aktivácie krvného zrážania <sup>14</sup>



### 3.2.5. Regulácia koagulácie

Každá fáza hemostatickej dráhy je spojená s inhibičnými zložkami. Len čo komplex TF-FVIIa stimuluje proces amplifikácie, je rýchlo inaktivovaný inhibítorom dráhy tkanivového faktora (TFPI), ktorý sa uvoľňuje keď trombín aktivuje doštičky. Podanie intravenózneho heparínu alebo subkutánneho heparínu s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMWH) vedie k uvoľneniu endoteliálneho TFPI. Najdôležitejším inhibítorom koagulácie je antitrombín, inhibítor serínovej proteázy. Bráni tvorbe fibrínu pomocou inaktívnych komplexov s trombínom a faktorom Xa. Trombín tiež proteolyticky aktivuje antikoagulačnú proteín C dráhu. Trombomodulín, receptor exprimovaný na povrchoch EB, sa viaže na trombín, čo vedie k aktivácii proteínu C. Aktivovaný proteín C spolu s proteínom S ako kofaktorom deaktivuje faktory Va a VIIIa, a tak znižujú amplifikačnú fázu koagulácie <sup>13</sup>.

### 3.2.6. Patológia hemostázy

Porucha hemostatickej rovnováhy sa môže prejaviť zvýšeným sklonom k trombóze alebo krvácanými stavmi <sup>6</sup>.

#### 3.2.6.1. Hemoragie

Môžu byť spôsobené poškodením funkcie trombocytov, cievnej steny, fibrinolytického systému a plazmatického koagulačného systému. Sú vyznačované spontánnymi krvácanými prejavmi či neúmerným krvácaním <sup>6</sup>.

##### 3.2.6.1.1. Krvácané stavy v dôsledku poškodenia trombocytov

A. Trombocytopenia (pod  $20 \times 10^9/l$ ) – je znížené množstvo krvných doštičiek. Idiopatická trombocytopenická purpura vzniká v dôsledku poškodenia membrány trombocytov. Akútna forma má spojitosť na predchádzajúce vírusové ochorenie. Má prudký priebeh (krvácanie zo slizníc, petechie bez zväčšenia sleziny) s očakávanou remisiou. Chronická forma je život neohrozujúca forma, má miernejší priebeh v porovnaní s akútnou formou. Pri terapii je dôležité utlmiť tvorbu protilátok pomocou imunoglobulínov, glukokortikoidov, imunosupresívami, interferónmi  $\alpha$ , danazolom a kyselinou askorbovou <sup>15</sup>.

B. Trombocytóza, trombocytémia ( $400 - 600$  až  $1000 \times 10^9/l$ ) – je zvýšené množstvo krvných doštičiek <sup>15</sup>. Môže vzniknúť ako sekundárny prejav pri zápalových ochoreniach,

psychickom napätí, zvýšenej fyzickej námahe, pri odstránení sleziny a Hodgikinovom lymfóme. Po vyriešení prvotných príčin, trombocytóza zmizne. Pri chronickej myeloidnej leukémii môže dôjsť až k trvalému zvýšeniu počtu trombocytov – trombocytémii <sup>15</sup>.

C. Trombocytopatie – vznikajú pri funkčnej nedostatočnosti. Môže sa prejavíť znížením prípadne zvýšením alebo zachovalým počtom trombocytov <sup>15</sup>. Medzi vrodené trombocytopatie zaraďujeme <sup>16</sup>:

- poruchu adhezivity (Bernardov-Soulierov syndróm) – je to dedičné ochorenie s defektom komplexu Ib/IX a glykoproteínu V, v dôsledku čoho doštička neviaže vWF <sup>16</sup>.
- poruchu agregability (Glanzmannova-Naegeliho tromboastenia) – dedičné ochorenie s defektom glykoproteínu IIb/IIIa, ktorý za fyziologických podmienok viaže fibrinogén, nutný k agregácii trombocytov <sup>16</sup>.
- porucha sekrécie doštičiek – poznáme dve formy a to poruchu skladovacích granúlí), kedy dochádza k nedostatku hustých  $\delta$ -granulí alebo  $\alpha$ -granulí, ktoré skladujú proagregačné zložky. Druhou formou je "aspirin-like-disease", teda defekt uvoľňovacích reakcií v dôsledku poruchy cyklu metabolismu AA a endoperoxidov <sup>16</sup>.
- porucha prokoagulačnej aktivity (Scottov syndrom) – je ochorenie, kedy dochádza k defektu väzby Va-Xa a VIIIa-IXa. Výsledkom je znížené uvoľňovanie trombínu a tvorby fibrínu <sup>16</sup>.

Do druhej skupiny teda získaných trombocytopatii zaraďujeme: poliekové trombocytopatie, autoimunitné poruchy, ochorenie pečene a obličiek, leukémie, lymfoproliferatívne ochorenie, myeloproliferatívny syndróm <sup>16</sup>.

#### **3.2.6.1.2. Purpury**

Sú prejavom defektu interakcie medzi cievnu stenou a trombocytmí. Medzi vrodené purpury patrí Morbus Rendu-Osler purpura. Toto dedičné ochorenie je spôsobené cievny rozšírením s krehkou cievnu stenou, ktorá praská pričom vzniká obťažne zastaviteľné krvácanie. Medzi získané purpury patrí Henochova-Schönleinova purpura. Je to ochorenie charakteristické zvýšenou priepustnosťou vlásočnic s orgánovými prejavmi. Môže vznikať pri alergickej odpovedi na lieky prípadne infekciu <sup>15</sup>. Skorbut je ochorenie, ktoré vzniká dlhodobým

nedostatkom vitamínu C, čo sa prejaví zvýšenou krehkosťou vlásočníc. Steroidná purpura sa prejavuje vznikom modrín u žien, ktoré sa liečia kortikosteroidmi <sup>15</sup>.

#### **3.2.6.1.3. Koagulopatie**

Vznikajú v dôsledku chýbania hemokoagulačných faktorov, pri zvýšenom množstve inhibítorov. Spontánne krvácanie a stupeň vážnosti závisí na poklese aktivity konkrétneho koagulačného faktora. Zvyčajne sa prejaví pri poranení prípadne chirurgickom zákroku. Taktiež rozlišujeme získané a vrodené formy. Vrodené sú ojedinelé a sú spojené poväčšine s absenciou jedného koagulačného faktora, čo sa prejaví krvácaním. Výnimkou je absencia prípadne porucha prekallikreinu a FXII, ktoré nie sú sprevádzané krvácaním ale práve naopak majú sklony ku tvorbe krvných zrazenín. Do vrodených koagulopatií patrí von Willebrandova choroba a hemofília. Získané koagulopatie sú naopak v dôsledku zníženia viacerých alebo celej skupiny koagulačných faktorov <sup>15</sup>. Hemofília sú nevyliciteľné ochorenia. Hemofília A je dedičné ochorenie, pri ktorom je porušená syntéza antihemofilického faktora A (FVIII). Nakoľko je ochorenie viazané na chromozóm X trpia ňou iba muži a ženy sú prenášačkami tohto ochorenia. Hemofília B je charakterizovaná defektom produkcie Christmasovho faktora (FIX). Rovnako ako u hemofílie A je viazaná na chromozóm X takže postihuje mužov <sup>12</sup>. Prejavy pri oboch typoch ochorenia sú skoro rovnaké. Krvácanie do kĺbov a svalstva môže vyústiť až v degeneráciu kĺbov a atrofiu svalstva. Rovnako tak môže nastať krvácanie aj do gastrointestinálneho (GIT) a centrálného nervového systému (CNS). Terapia hemofílie je substitučná a podporná. Von Willebrandova choroba je ochorenie vyvolané defektom alebo nedostatkom príslušného faktora (vWF) čo ďalej vedie aj k zníženiu antihemofilického faktora A (VIII). Je narušená ako primárna tak aj sekundárna hemostáza <sup>15</sup>.

#### **3.2.6.1.4. Hemorágie z iných príčin**

Diseminovaná intravaskulárna koagulácia je získané koagulačné ochorenie, ktoré je sprevádzané aktiváciou hemostázy, produkciou malých mikrotrombov, čo môže viesť k ischemickému orgánovému zlyhaniu. Je zvýšená spotreba koagulačných faktorov, úbytok inhibítorov koagulácie a aktivácia sekundárneho rozpúšťania krvnej zrazeniny, teda fibrinolýzy. Dôvody môžu byť viaceré: trauma, šok, popáleniny, bakteriálne/vírusové infekcie, ochorenia pečene, malígne ochorenia prípadne pôrodné komplikácie <sup>15</sup>.

Terapia sa skladá z aplikácie heparínu pre zastavenie tvorby mikrotrombov, transfúzie krvi/plazmy, koncentrátov fibrinogénu a antitrombínu III <sup>15</sup>.

#### **3.2.6.2. Trombofílie**

Ochorenie prejavujúce sa u pacientov, ktorí majú z nejakej príčiny narušený proces hemostázy, čo môže viesť ku tvorbe krvných zrazenín. Rozlišujeme získané a vrodené trombofílie. Medzi najčastejšie sa prejavujúce trombofílie patrí Leidenská mutácia faktoru V, syndróm lepivých doštičiek, SPS syndróm, mutácia protrombínu, APS syndróm. Menej prejavujúce sa defekty v populácii sú hyperhomocysteinémia, defekty AT III, proteínu C a proteínu S. Pri terapii sa využíva antitrombotická liečba, ktorú môžeme deliť na trombolytickú, antikoagulačnú, antiagregačnú a substitučnú <sup>15</sup>.

### 3.3. Alzheimerova choroba

S pribúdajúcim vekom a progresívnym starnutím svetovej populácie ovplyvňujú neurodegeneratívne poruchy väčší podiel jednotlivcov na celom svete <sup>17</sup>. Predpokladá sa, že patofyziologický proces Alzheimerovej choroby (AD) začína mnoho rokov pred diagnózou demencie <sup>1</sup>.

S prevalenciou 1 % populácie patrí AD medzi najčastejšiu formu demencie, pričom je v rebríčku na štvrtom až piatom mieste príčinou úmrtia. Podľa štúdie WHO z roku 2016 sa predpokladá, že nárast pacientov s AD sa v roku 2050 strojnásobí na cca 135,5 miliónov. AD môžeme rozdeliť na sporadickú formu ochorenia a familiárnu (genetickú) formu <sup>2</sup>. Familiárna forma môže byť spôsobená variabilnými mutáciami jedného génu na chromozómoch 1, 14 a 21. Mutácie na chromozóme 1 vedú k zmenám presenilínu 2, mutácie na chromozóme 14 vedú k zmenám presenilínu 1 a mutácie na chromozóme 21 vedú k zmenám amyloidného prekursorového proteínu (APP) <sup>17</sup>. Medzi dedičnú formu AD zaraďujeme aj prítomnosť génu pre apolipoproteín E4 na chromozóme 19 <sup>2</sup>. Vek nástupu a klinická manifestácia sa vo familiárnej AD zvyčajne vyskytuje pred dosiahnutím 55 rokov. K vzniku sporadickej AD môže viesť viacero faktorov. Tieto faktory zahŕňajú oxidačný stres, dysfunkciu bunkového metabolizmu, toxicitu  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ),  $\tau$ -skupín, poškodenia spôsobené xenobiotikami, mitochondriálnym poškodením, stratou acetylcholínu (ACh) a prítomnosťou ťažkých kovov. Nové štúdie tiež poukazujú na tromboxánový  $A_2$  receptor, ktorý môže viesť k zvýšenej sekrécii  $A\beta$  <sup>17</sup>.

Aj keď je AD prevažne známa ako neurologická porucha, postihuje periférne tkanivá so zmenami v krvných bunkách a aj v cievach <sup>18</sup>. Faktory kardiovaskulárneho rizika (hypercholesterolémia, hypertenzia, obezita, ateroskleróza) zvyšujú riziko cievneho poškodenia a AD. Naopak, pacienti s AD výrazne zvýšili predispozíciu k ischemickým a hemoragickým mozgovým príhodám <sup>17</sup>. Napríklad ženy s anamnézou infarktu myokardu (MI) mali päťkrát vyššie riziko vzniku demencie, ako ženy bez MI <sup>19</sup>.

Medzi ďalšie rizikové faktory patrí vysoký vek, ženské pohlavie, genetika, nízky stupeň vzdelania, opakované úrazy hlavy. Diabetes druhého typu je rizikovým faktorom pre AD <sup>20</sup>.

Enzým, ktorý je zodpovedný za degradáciu inzulínu v mozgu je zároveň zodpovedný aj za odbúravanie A $\beta$ . U ľudí s Downovým syndrómom, ktorí sa dožijú 40 roku veku sa vyvíjajú abnormality v mozgu, ktoré sú charakteristické pre AD. Vedci prikladajú význam aj faktorom ako sú nedostatok pohybu, stres, nezdravý životný štýl a taktiež toxické vplyvy prostredia, vírusové infekcie, poruchy imunitného systému. Za protektívne faktory sa považuje užívanie antiflogistik, hormonálnej substitúcie pre ženy po menopauze, vyššie vzdelanie, vyššia psychická aktivita, včasná a účinná liečba depresii a neklesajúca psychická aktivita vo vyššom veku <sup>20</sup>.

Z neuropatologického hľadiska je choroba definovaná senilnými plakmi, neurofibrilárnymi spleteniami a cerebrálnou amyloidnou angiopatiou (CAA) ako hlavnými patologickými znakmi <sup>21</sup>. CAA je dôležitým faktorom závažnosti patológie AD, pretože vyvoláva degeneráciu komponentov cievnych stien, ovplyvňuje tok krvi mozgom a zhoršuje kognitívne funkcie <sup>22</sup>. Tieto patológie sú dôsledne a silne distribuované vo frontálnom neokortexe a limbickom systéme pacientov s AD <sup>23</sup>. Hlavnou proteínovou zložkou senilných plakov je samoskladajúci sa peptid známy ako A $\beta$ . Metabolizmus APP môže viesť k jeho amyloidnému alebo neamyloidnému spracovaniu. Na metabolizme APP sa zúčastňujú najmenej tri rôzne proteolytické enzýmy:  $\alpha$ -sekretáza štiepi APP v extracelulárnej doméne a určuje uvoľňovanie sAPP- $\alpha$  do extracelulárneho priestoru. Toto proteolytické štiepenie sa vyskytuje v sekvencii A $\beta$  a preto bráni tvorbe amyloidných fragmentov. BACE štiepi APP na aminokonce a  $\gamma$ -sekretáza štiepi APP na karboxylovom konci A $\beta$  uvoľňujúceho A $\beta$ , ktorý má dĺžku buď 40 aminokyselín (A $\beta$ 40) alebo 42 aminokyselín (A $\beta$ 42) <sup>21</sup>. A $\beta$ -40, kratšia forma končiaca valínom, ktorá prevažuje je rozpustná a vylučovaná telom. A $\beta$ -42, dlhšia forma končiaca alanínom, agreguje rýchlejšie a je začínajúcou a dominujúcou formou A $\beta$  uskladneného v plakoch <sup>24</sup>. Ukázalo sa, že cholinergné látky môžu aktivovať neamyloidnú dráhu, ktorá bráni tvorbe. A $\beta$ . Na podpore neamyloidného spracovania APP sa podieľa množstvo ďalších receptorov, ako sú glutamátové, serotonínové receptory a bradykiníny <sup>25</sup>. Ďalšou patológiou AD je úbytok cholinacetyltransferázy, pričom táto redukcia aktivity je až 50 – 90 % <sup>26</sup>. Pre zvýšenie hladiny nedostatkového Ach na cholinergných synapsiách využívame v terapii inhibítory acetylcholinesterázy (AChE) <sup>27</sup>. V neuropatológii sa uplatňujú aj krvné doštičky. Ich súvislosť s AD si detailnejšie rozoberieme.

### 3.3.1. Hemostáza a Alzheimerova choroba

#### 3.3.1.1. Krvné doštičky a A $\beta$ peptid

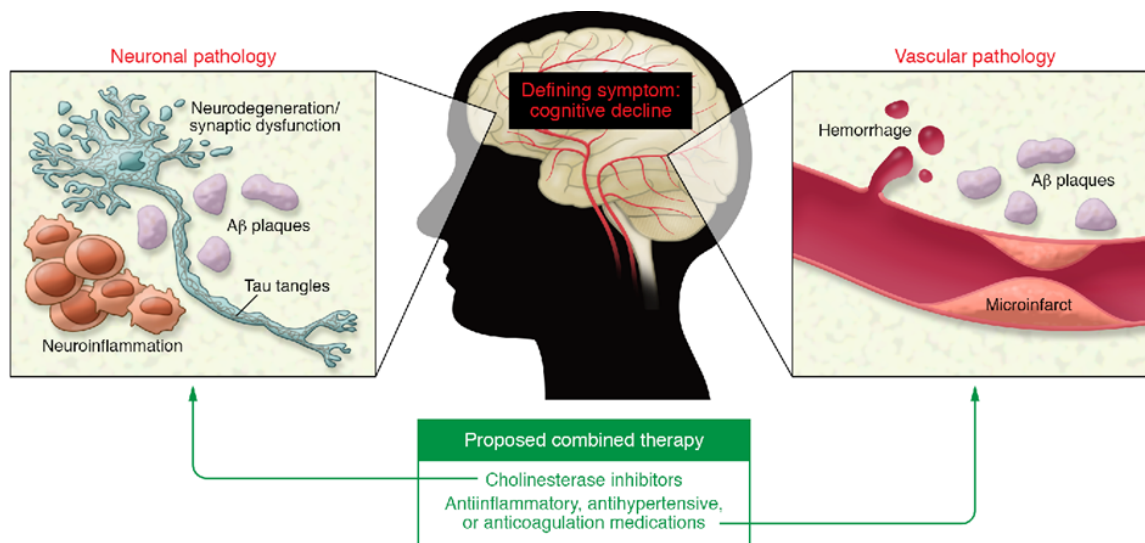
Krvné doštičky sú hlavnými zložkami v hemostáze, ale podieľajú sa aj na neuroinflamačných ochoreniach ako je AD, pretože vykazujú enzymatickú aktivitu na tvorbu A $\beta$  peptidov<sup>3</sup>. Krvné doštičky sú teda primárnym zdrojom peptidov A $\beta$  v ľudskej krvi. Plazmatické hladiny A $\beta$  môžu preto závisieť od aktivácie krvných doštičiek. Taktiež bol v mozgu a doštičkách pacientov s AD zaznamenaný zmenený metabolizmus a aktivita niekoľkých enzýmov ako je fosfolipáza A, fosfolipáza C a COX, pričom sa znižuje aj počet hustých granúl v trombocytoch. Tieto zmeny uprednostňujú oxidačné procesy v mozgu a krvných doštičkách v AD. Opláštené krvné doštičky sú podskupinou krvných doštičiek produkovaných duálnou agonistickou aktiváciou s kolagénom a trombínom. Tieto krvné doštičky si na svojom povrchu zachovávajú APP v plnej dĺžke<sup>28</sup>. Zatiaľ čo krvné doštičky nie sú schopné absorbovať syntetický vopred agregovaný A $\beta$ , indukcia apoptózy krvných doštičiek umožňuje krvným doštičkám absorbovať A $\beta$ . Vedci preukázali, že trombín a prostaglandín 2 regulujú spracovanie a sekréciu A $\beta$  peptidov v ľudských doštičkách. Doštičky uvoľňujú A $\beta$  v závislosti od dávky a času, keď prídu do styku s rozpustným exogénnym A $\beta$ , ktorý je tiež prítomný v krvi za fyziologických a patofyziologických podmienok. V štúdii sa zistilo množstvo uvoľneného A $\beta$  po stimulácii A $\beta$ , ktoré bolo 10–krát vyššie v porovnaní so stimuláciou agonistami krvných doštičiek. Aplikácia exogénnej A $\beta$  (1–2  $\mu$ M) zosilnila agregáciu krvných doštičiek sprostredkovanú kolagénom a inými agonistami, zatiaľ čo pri vyšších koncentráciách (5–10  $\mu$ M) indukoval A $\beta$  agregáciu krvných doštičiek bez ďalšieho stimulu. A $\beta$  zosilňuje aj odpovede doštičiek indukované slabým agonistom doštičiek, ADP. Autori dospeli k záveru, že makrofágy dopravujú A $\beta$  z neurónov do ciev, kde sa podrobujú apoptóze a následne uvoľňujú fibrilárny A $\beta$  prispievajúci k CAA<sup>3</sup>.

Za fyziologických podmienok krvné doštičky metabolizujú APP neamyloidnou cestou:  $\alpha$ -sekretáza sa aktivuje pomocou Ca<sup>2+</sup> a kalmodulínu a uvoľňuje sAPP $\alpha$  (rozpustný APP $\alpha$ ), ktorý reguluje trombózu a hemostázu *in vivo*. V AD sa však aktivita  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy zvyšuje a APP je metabolizovaný za vzniku A $\beta$  peptidov, čo vedie k zmene obsahu APP v krvných doštičkách. Fragmenty sAPP a A $\beta$  peptidy sa ukladajú do  $\alpha$ -granúl doštičiek a uvoľňujú sa po stimulácii fyziologickými agonistami<sup>29</sup>.

Niekoľko štúdií naznačilo, že A $\beta$  peptidy z krvných doštičiek môžu predstavovať spoľahlivý periférny biomarker AD. Nesprávne uložené A $\beta$  peptidy indukujú aktiváciu a agregáciu krvných doštičiek prostredníctvom dvoch rôznych dráh iniciovaných CD36 alebo GPIb. Krátky peptid zodpovedajúci biologicky aktívnej sekvencii A $\beta$  (A $\beta$ 25-35) je schopný aktivovať krvné doštičky a potenciovateľ agregáciu krvných doštičiek indukovanú nízkymi dávkami kolagénu, ADP a trombínu prostredníctvom fosfoinozitol 3-kinázy (PI3K) a mitogénom aktivovaná proteínkináza (p38MAPK). Jedna z najzaujímavejších hypotéz o mechanizme toxicity A $\beta$  je založená na schopnosti A $\beta$  peptidov tvoriť póry v bunkových membránach priepustných pre kationy, čo nakoniec vedie k depolarizácii membrán, úniku Ca<sup>2+</sup> iónov a narušeniu iónovej homeostázy. Ukázalo sa, že A $\beta$  peptidy stimulujú mobilizáciu Ca<sup>2+</sup> iónov a sekréciu granúl<sup>29</sup>. Uvoľňovanie ADP, ktoré je výsledkom hustej sekrécie granúl, hrá rozhodujúcu úlohu vo zvýšení aktivácii intracelulárnych signálnych dráh pre aktiváciu doštičiek, čo dokumentuje zvýšená fosforylácia tyrozínkinázy (Pyk2), proteín kináza B (Akt), p38MAPK a kinázy myozínového ľahkého reťazca<sup>18</sup>.

Tieto udalosti podporujú agregáciu krvných doštičiek a tvorbu trombu v krvi pod fyziologickým stresom. Preto sa navrhuje aby uvoľňovanie hustých granúl a vylučovanie ADP sprostredkovanej Ca<sup>2+</sup> iónmi bolo skorou udalosťou pri stimulácii trombocytov pomocou A $\beta$ 25-35. Ukázalo sa, že predinkubácia krvných doštičiek s enzýmom apyrázou vychytávajúcou ADP, silne znižuje agregáciu krvných doštičiek indukovanou A $\beta$ 25-35. Aktivácia GTPázy Rap1b a následne integrínová  $\alpha_{IIb}\beta_3$  stimulácia sú tiež závislé od ADP. Fosforylácia a aktivácia signálnych proteínov: tyrozín proteín kináza (Syk), proteínkinázy C (PKC), PI3K a p38MAPK a extracelulárna regulačná proteínkináza  $\frac{1}{2}$  (ERK1/2) indukovaných A $\beta$ 25-35 silne závisí od ADP, pretože je to výrazne znížené v prítomnosti apyrázy a P2Y inhibítorov receptorov. ADP dependentná aktivácia signalizácie prostredníctvom niekoľkých intracelulárnych proteínkinázových dráh a aktivácia Rap1b hrajú významnú úlohu pri stimulácii agregácie krvných doštičiek a tvorbe trombu. Aktivácia Rap1b vedie k integrínovej signalizácii zvnútra a stimuluje väzbu fibrinogénu na základe kľúčových fyziologických javov ako je agregácia krvných doštičiek a tvorba trombu<sup>29</sup>.





**Obr.3 Patogénne dráhy AD s možným terapeutickým cieľom <sup>30</sup>**

Nedávna štúdia s pacientmi s AD s oneskoreným nástupom (LOAD) odhalila, že vaskulárna dysregulácia je najskoršou a najsilnejšou patológiou mozgu spojenou s LOAD. Analýza pacientov s AD so včasným nástupom (EOAD), poskytuje silný dôkaz o prepojení medzi AD a vaskulárnou patológiou. EOAD asociované mutácie sa vyskytujú v APP, z ktorého je odvodený Aβ-peptid alebo v γ-sekretáze, ktorá pomáha excitovať Aβ z APP. Prvé abnormality zistené u týchto pacientov s EOAD sú zmeny hladín Aβ, ktoré sa vyskytujú približne 30 rokov pred nástupom príznakov. Ďalšou patológiou je hyperintenzita bielej hmoty (WMH). WMH sú súčasťou spektra cerebrovaskulárnych chorôb malých ciev, ischemickej a hemoragickej mŕtvice, atrofie mozgu, chronickej hypoperfúzie a zvýšenej permeability hematoencefalickej bariéry. Súvislosť medzi AD a cerebrovaskulárnym ochorením vyplýva z patologických dôsledkov u pacientov s autozomálne dominantnými mutáciami. Mutácie v sekvencii Aβ (napríklad flámske, holandské, iowa a talianske mutácie) sú spojené s masívnou CAA, čo vedie k oslabeniu steny ciev a častým infarktom a krvácaním. Mutácie v presenilíne 1, bielkovinovej zložky γ-sekretázy, ktorá pomáha uvoľňovať Aβ z APP, môžu tiež vykazovať závažné cerebrovaskulárne účinky <sup>30</sup>.

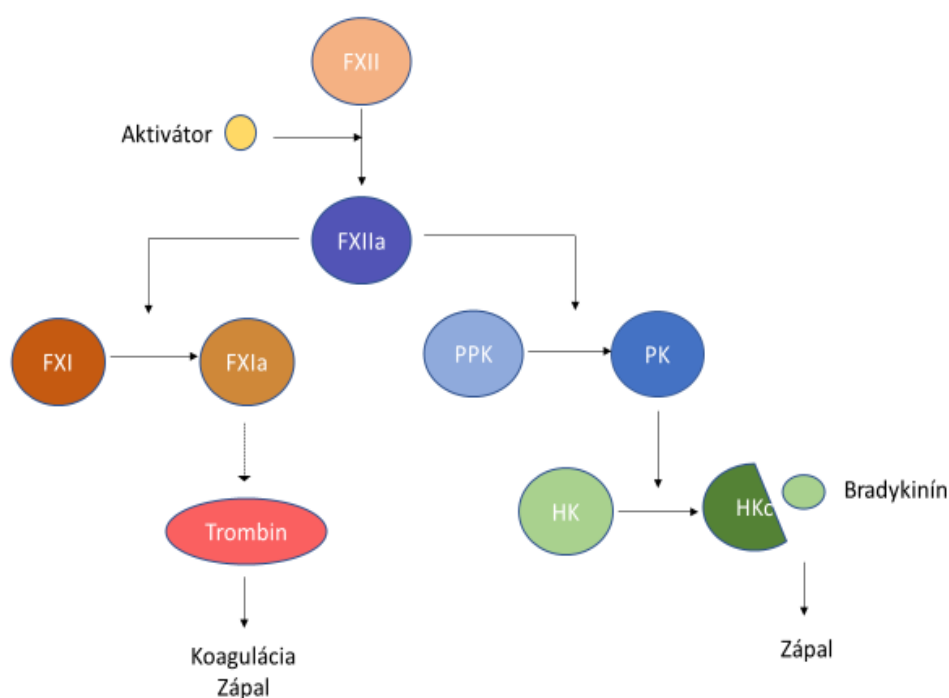
Analýza vzoriek periférnej krvi od 40 pacientov s AD okrem toho poskytla dôkaz o zvýšenej miere agregácie krvných doštičiek v porovnaní so zdravými kontrolami. Ukázalo sa, že znížená aktivita eNOS nasledovaná zníženými koncentráciami NO doštičiek u pacientov s AD spôsobuje zvýšenú agregáciu krvných doštičiek, pretože NO je účinný inhibítor trombocytov. V súlade s týmto pozorovaním vedci zistili trvalo zvýšenú aktiváciu krvných doštičiek pri AD, čo dokazuje zvýšená peroxidácia lipidov a nedostatočné hladiny vitamínu E. U pacientov s AD s rýchlym kognitívnym poklesom sa v porovnaní s pacientmi s pomalým kognitívnym poklesom detegovali vyššie hladiny expresie integrínu  $\alpha_{IIb}\beta_3$  a P-selektínu, používané ako klasické markery aktivácie doštičiek. Preukázala sa zvýšená apoptóza trombocytov a makrofágov po expozícii A $\beta$  a takto zrýchlená apoptóza trombocytov by preto mohla u pacientov spôsobiť trombocytopéniu, ktorá bola opísaná ako komplikácia amyloidózy <sup>31</sup>.

### **3.3.1.2. Vnútorný koagulačný systém**

Tento systém sa iniciuje, keď je plazmatický proteín FXII vystavený negatívne nabitým povrchom. Kontaktom aktivovaný FXII (FXIIa) štiepi plazmatický prekallikreín na kallikreín, ktorý potom uvoľňuje prozápalový mediátor bradykinín z kininogénu s vysokou molekulovou hmotnosťou (HK) <sup>32</sup>. Bradykinín je silný nonapeptidový vazodilatátor, ktorý môže aktivovať zápalové procesy <sup>30</sup>. Okrem toho štiepenie HK v plazme pacientov s AD nepriamo koreluje s hladinami A $\beta$ 42 v mozgovomiechovom moku čo naznačuje, že aktivácia kallikreín-kinínového systému sprostredkovaná FXII môže byť skorým procesom vývoja ochorenia. Okrem aktivácie prekallikreínu, FXIIa tiež aktivuje faktor XI (FXI) vo vnútornej koagulačnej kaskáde, čo vedie k tvorbe trombínu, premene fibrinogénu na fibrín a tvorbe zrazenín. A $\beta$  môže podporovať tvorbu trombínu prostredníctvom aktivácie FXI závislej od FXII <sup>30</sup>. Negatívny náboj a/alebo prítomnosť kyseliny glutámovej v pozícii 22 Ap42 sa javí ako rozhodujúca pre aktiváciu FXII a FXI <sup>33</sup>.

Štúdie naznačujú, že A $\beta$  je aktivátor FXII schopný spustiť protrombotické aj zápalové dráhy, čo poskytuje nový mechanizmus, ktorým môžu byť tieto procesy aktivované pri AD. Vedci uvádzajú nový mechanizmus prispievajúci k neurónovej dysfunkcii pri AD<sup>32</sup>. Aktivácia FXII pomocou A $\beta$  peptidu (priamo alebo nepriamo) vedie k aktivácii vnútornej koagulačnej dráhy prostredníctvom FXI sprostredkovanej FXII a k uvoľneniu prozápalového bradykinínu

sprostredkovaného kallikreínom. Zvýšené hladiny perzistentného fibrínu v AD spolu so zvýšenou aktiváciou kallikreín-kinínového systému môžu viesť k oklúzii a zápalu ciev pri AD. Zároveň zhoršujú vaskulárnu funkciu a prispievajú k poklesu kognitívnych funkcií <sup>32</sup>. Na základe týchto úvah by sľubným terapeutickým prístupom k spomaleniu progresie ochorenia bez ovplyvnenia fyziologickej hemostázy mohlo byť blokovanie aktivácie kontaktného systému. Tento prístup by tiež blokoval uvoľňovanie bradykinínu z HK a znížil zápal. Inhibitor PK, ecallantid, je už schválený FDA na liečenie dedičného angioedému, stavu, ktorý je výsledkom aktivácie nadmerného kontaktného systému. Zníženie prietoku krvi môže viesť k hypoxickým tkanivám a indukcii hypoxiou indukovateľného faktora HIF-1 $\alpha$ . Tento transkripčný faktor môže aktivovať  $\gamma$ -sekretázu, čo by mohlo viesť k zvýšenej produkcii A $\beta$ . Dá sa teda predpokladať začarovaný cyklus, v ktorom A $\beta$  spôsobuje vaskulárnu nedostatočnosť, čo zase vedie k zvýšeniu A $\beta$  <sup>30</sup>. Trombín sprostredkováva aj rozklad hematoencefalickej bariéry (BBB) a výsledný prístup plazmatických bielkovín k cievnej stene a parenchýmu mozgu by mohol prispieť k poškodeniu ciev a neurónov. Zacielenie na FXII, vnútornú koagulačnú cestu, trombínovú aktivitu a v AD by preto mohlo poskytnúť nové terapeutické príležitosti <sup>33</sup>.

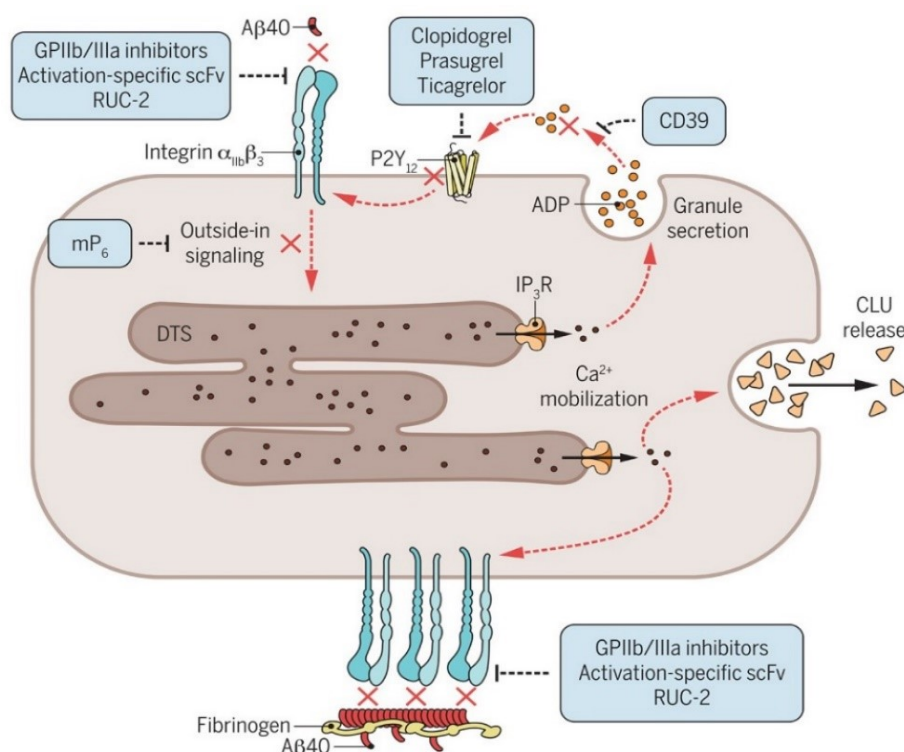


**Obr.4 Vnútorný systém zrážania krvi a jej úloha v AD <sup>30</sup>**

### 3.3.1.3. Receptor adhézie doštičiek

Hlavný receptor adhézie doštičiek, integrín  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , sa viaže na monomérny A $\beta$ , a následne spôsobuje aktiváciu Syk a fosfolipázy C gamma-2 (PLCG2), čo nakoniec vedie k uvoľneniu klastínu a ADP z aktivovaných krvných doštičiek. Uvoľňovanie chaperónového klastínu hrá dôležitú úlohu pri uľahčovaní agregácie A $\beta$  fibríl a teda patogenéze AD. Vzhľadom na viacnásobné spôsoby sprostredkovania aktivácie krvných doštičiek by ďalšou cestou vpred mohla byť kombinácia protidoštičkovej terapie použitím inhibítora P2Y<sub>12</sub> v spojení s aspirínom (ASA), ako sa bežne používa u pacientov s koronárnou implantáciou stentu. Klinické štúdie však doteraz nepreukázali žiadny prínos antiagregačnej liečby pomocou ASA u pacientov so zavedenou AD. Všetky v súčasnosti schválené protidoštičkové lieky, najmä ak sa používajú v kombinácii, sú spojené so značnými krvácavými komplikáciami, vrátane intracerebrálneho krvácania <sup>34</sup>.

Vzhľadom na preukázanú ústrednú úlohu  $\alpha_{IIb}\beta_3$  a ADP by jedným potenciálnym prístupom bola priama inhibícia interakcie medzi A $\beta$  a  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . V súčasnosti schválené  $\alpha_{IIb}\beta_3$  antagonisti sa môžu podávať iba intravenózne. Novší antagonisti  $\alpha_{IIb}\beta_3$  v predklinickom vývoji, ako je RUC-2, sa viažu a blokujú neaktivovaný  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Dlhodobá blokáda tohto integrínu všetkých cirkulujúcich krvných doštičiek však pravdepodobne predstavuje vysoké riziko krvácania. Preto rekombinantná jednoreťazcová protilátka (scFv), ktorá blokuje iba aktivovaný  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , neindukuje paradoxnú aktiváciu krvných doštičiek a preukázalo sa, že je spojená s nižším rizikom krvácania v porovnaní so štandardnými antagonistami  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Okrem úlohy integrínu  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , vedci preukázali základnú úlohu ADP pri podpore agregácie A $\beta$ . Preto schopnosť inhibovať ako aktivovaný  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , tak ADP môže byť vysoko žiaducou terapeutickou stratégiou. Opisovaná rekombinantná scFv, ktorá sa špecificky zameriava na aktivovaný  $\alpha_{IIb}\beta_3$  a obsahuje katalytickú CD39 s apyrázovou aktivitou, čím degraduje ADP, sa javí ako atraktívny nový terapeutický prístup. Pretože sa ukázalo, že interakcia krvných doštičiek s niekoľkými rôznymi amyloidnými vláknami sa môže inhibovať pomocou tripeptidovej sekvencie arginín-glycín-aspartát (RGD sekvencia) naznačuje, že integrín  $\alpha_{IIb}\beta_3$  doštičiek je v skutočnosti priamym väzobným partnerom <sup>34</sup>.



**Obr.5** Spojitosť medzi aktiváciou krvných doštičiek a tvorbov agregátov Aβ v AD <sup>4</sup>

#### 3.3.1.4. Fibrinogén

Fibrinogén je plazmatický proteín, ktorý sa po štiepení trombínom premieňa na fibrín, ktorý polymerizuje na fibrínovú sieť alebo sa zráža. Fibrinogén ďalej prispieva k hemostáze tým, že vytvára mostíky medzi aktivovanými doštičkami a podporuje ich agregáciu. Okrem svojej úlohy pri koagulácii má fibrinogén adhezívne a zápalové funkcie. Fibrinogén viaže integrín  $\alpha_M\beta_2$  prítomný v aktivovaných leukocytoch, čo je nevyhnutné pre zápalovú odpoveď.<sup>35</sup> Zároveň zabraňuje remyelinizácii a regenerácii axónov po poranení periférnych nervov a reguluje tvorbu gliových jaziev po úrazoch mozgu. Za fyziologických podmienok cirkuluje fibrinogén cez mozog a vaskulatúru miechy bez vstupu do CNS, kôli prepracovanej architektúre cievnych stien v CNS, ktoré tvoria BBB. Výsledkom chronického narušenia BBB (depozícia fibrinogénu v CNS) môže byť AD, mozgový glioblastóm, HIV encefalitída a bakteriálna meningitída. V mozgu AD bolo identifikovaných niekoľko koagulačných faktorov, ktoré unikajú z narušenej vaskulatury, najmä v pokročilých štádiách choroby, vrátane protrombínu, faktora VIII, vWF a fibrinogénu. Mozgy pacientov po chorobe AD boli analyzované pomocou protilátok, ktoré nerozlišujú rozpustný fibrinogén a nerozpustný fibrín <sup>36</sup>. Tieto štúdie preukázali rozsiahlu

depozíciu fibrinogénu/fibrínu v mozgu, čo bolo v niektorých prípadoch pripisované priepustnosti BBB. Ďalšie štúdie využívajúce extrakčné postupy, ktoré odstraňujú všetok rozpustný fibrinogén a zafarbenie protilátkami špecifickými pre fibrín ukázali, že nerozpustný fibrín sa v mozgu pacientov s AD v porovnaní s nedementnými kontrolami výrazne zvyšuje, pričom rozdiely v niektorých oblastiach dosahujú 100-násobok <sup>30</sup>. Vedci preukázali, že samotná injekcia fibrinogénu do hippocampu indukuje mikrogliózu, priepustnosť BBB a smrť neurónov, čo sa však ešte zhoršilo, keď sa A $\beta$  injektoval súčasne s fibrinogénom. Interakcia A $\beta$ -fibrinogén podporuje depozíciu fibrinogénu a A $\beta$  v mozgovom parenchýme, cievach AD a indukuje tvorbu abnormálnych fibrínových zrazenín, ktoré sú odolnejšie voči degradácii. Fibrinogén hrá pri patogenéze AD rozhodujúcu úlohu nasledujúcimi vzťahmi <sup>35</sup>:

- vysoké hladiny fibrinogénu v plazme zvyšujú riziko demencie u ľudí <sup>35</sup>.
- farmakologická alebo genetická deplécia fibrinogénu v AD myších modeloch znižuje dysfunkciu BBB, neurovaskulárne poškodenie, neuroinflamáciu, patológiu CAA a zlepšuje kognitívnu funkciu <sup>35</sup>.
- antikoagulačná liečba u pacientov a AD myší vykazovala zlepšenie pamäte alebo pomalší kognitívny pokles v porovnaní s kontrolami <sup>35</sup>.
- existuje súvislosť medzi mŕtvicou/mikroinfarktmi a AD <sup>35</sup>.
- fibrinogén v mozgovomiechovom moku bol identifikovaný ako užitočný biomarker na rozlíšenie medzi AD a kognitívne normálnymi alebo mierne dementnými pacientmi a koreluje s progresiou ochorenia <sup>35</sup>.

Vedci nedávno objavili, že fibrinogén v krvnom riečisku slúži aj ako nosič latentného transformujúceho rastového faktora  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Pretože TGF- $\beta$  je tiež zavedeným regulátorom zápalu, úloha fibrinogénu pri prenášaní latentnej formy TGF- $\beta$  do tkanív môže tiež predstavovať potenciálne dôležitý mechanizmus regulácie lokálnych zápalových procesov. TGF- $\beta$  má silné imunosupresívne funkcie, kontroluje proliferáciu imunitných buniek a reguluje vývoj imunitných odpovedí. Okrem toho môže TGF- $\beta$  potlačiť aktiváciu makrofágov, dendritických a prírodných zabíjačov buniek <sup>36</sup>. Napríklad TGF- $\beta$  inhibuje indukciu syntézy

oxidu dusnatého a MMP-12, ako aj MyD88-dependentných TLR signálnych dráh v makrofágoch. Dodanie silného regulátora vrodenej aj adaptívnych imunitných reakcií v tkanivách s ukladaním fibrínu, by mohlo predstavovať novú úlohu fibrinogénu v regulácii zápalu, ako dôležitú terapeutickú látku <sup>36</sup>. Ďalším dôkazom podporujúcim dôležitú úlohu fibrinogénu a tvorby zrazenín pri AD sú pozitívne výsledky získané pri antikoagulačnej liečbe tohto ochorenia. Aj keď tieto štúdie boli malé, antikoagulačná liečba buď zastavila zhoršenie alebo vyvolala zlepšenie choroby. Štúdia uskutočnená na pacientoch s fibriláciou predsiení, známym vaskulárnym rizikovým faktorom AD ukázala, že subjekty užívajúce antikoagulantia predstavujú v menšej miere kognitívne poškodenie ako tí, ktorí antikoagulantami neboli liečení <sup>22</sup>. Mechanizmus, ktorým fibrín urýchľuje degeneráciu neurónov, zostáva neznámy. Existujú dve pravdepodobné možnosti <sup>30</sup>:

1. oklúzia — fibrínové zrazeniny sa ukladajú vo vaskulárnom a perivaskulárnom priestore, čo má za následok znížený prietok krvi, zvýšenú akumuláciu A $\beta$  v dôsledku väzby na zrazeniny a poškodenie neurónov v dôsledku nedostatku kyslíka a živín <sup>30</sup>.

2. zápal — vklady fibrínu vedú k chronickému zápalovému stavu, ktorý vedie k poškodeniu buniek. AD je spojená so zápalom, ktorý v niektorých prípadoch môže byť prospešnou odpoveďou, ale v iných prípadoch môže byť toxický pre bunky. Mozgy pacientov s AD majú zvýšený zápal, mutácie v imunitných molekulách vedú k zvýšenému riziku AD a nesteroidné protizápalové lieky vykazujú určité účinky pri znižovaní tohto rizika v AD <sup>30</sup>.

### **3.3.1.5. Neprilyzín**

Neprilyzín je endogénna proteáza, ktorá degraduje širokú škálu peptidov vrátane A $\beta$ . Vedci navrhli neprilyzín ako potenciálne liečivo na terapiu AD, ale v predklinickom testovaní bezpečnosti sa zistilo, že tento variant predlžuje PT a aktivuje čiastočne aPTT. Fibrinogén bol preto prvýkrát identifikovaný ako substrát pre NEP, čo naznačuje, že enzým môže mať úlohu pri regulácii tvorby fibrínu. Zníženie hladín NEP pozorované pri AD a CAA môže prispieť k neurovaskulárnej degenerácii pozorovanej pri týchto stavoch <sup>37</sup>. Ukázalo sa, že A $\beta$ 42 interaguje priamo s fibrinogénom blízko C-konca B reťazca a mení štruktúru fibrínovej

zrazeniny *in vitro*, čím je rezistentnejší voči degradácii plazmínom. NEP môže preto ovplyvňovať depozíciu fibrinogénu dvoma spôsobmi <sup>37</sup>:

1. znížením hladín A $\beta$  v cievach a tým ovplyvniť jeho interakciu s fibrinogénom <sup>37</sup>.

2. priamym znížením schopnosti fibrinogénu tvoriť stabilné zrazeniny a tým je menej pravdepodobné, že sa vytvoria zmenené štruktúry zrazenín odolné voči plazmínu <sup>37</sup>.

### **3.3.1.6. Zápal**

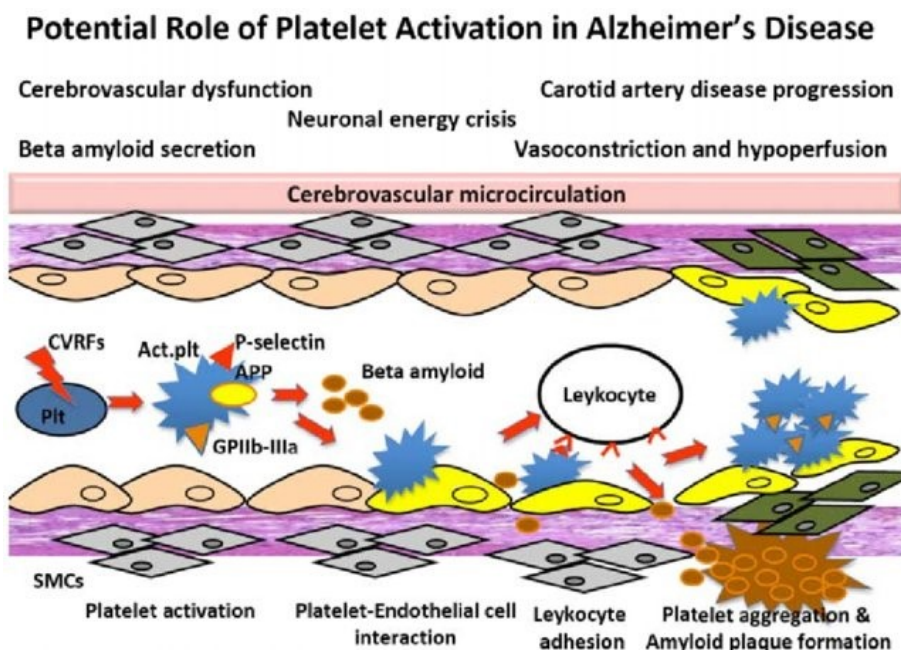
Charakteristickým znakom AD je zápal mozgu. Predpokladá sa, že mikroglie majú podpornú úlohu pre neuróny. V zásade však ide o špecializované imunitné bunky, ktoré môžu mať fagocytárne účinky pri aktivácii. V zraniteľných oblastiach mozgu AD sú prakticky všetky agregované A $\beta$  depozity husto osídlené aktivovanými mikrogliami. Aktivované mikroglie sa všeobecne považujú za hlavnú úlohu pri zápaloch AD <sup>23</sup>.

Zápalové bunky, ako sú neutrofily alebo monocyty môžu interagovať s krvnými doštičkami, ktoré sprostredkujú ich adhéziu na stenu ciev. Krvné doštičky sú sprostredkovaním náboru zápalových buniek hlavným zdrojom pro-zápalových chemokínov a cytokínov a môžu tiež podporovať zápal uvoľňovaním mikročastíc. Krvné doštičky sú schopné indukovať reakciu akútnej fázy hlavne kôli ich schopnosti produkovať IL1b, ktorý nie je molekulou uloženou v granulách. Po aktivácii doštičky syntetizujú, spracúvajú a vylučujú IL1b, ktorý sa nachádza v okluzívnych tromboch niekoľko hodín po poškodení cievnych stien. Vzájomné pôsobenie krvných doštičiek, leukocytov a mozgového endotelu môže teda modulovať priebeh neuropatických zápalových chorôb, ako je mozgová príhoda, AD a roztrúsená skleróza. Spoločným menovateľom týchto chorôb je nesprávne skladanie proteínov, ktoré môže indukovať agregáciu krvných doštičiek s následnou expresiou receptorov aktivovaných proliferátormi peroxizómov a uvoľňovaním proinflamačných mediátorov z krvných doštičiek <sup>38</sup>.

Dva doštičkové enzýmy spojené so zápalovým procesom, fosfolipáza A2 a cyklooxygenáza-2 (COX-2) vykazujú zvýšenú aktivitu u pacientov s AD. Okrem toho bola u pacientov s AD zvýšená adhézna molekula-1 endoteliálnych buniek krvných doštičiek a intercelulárna adhézna molekula-1 <sup>39</sup>. Tvorba a veľkosť doštičiek by sa mohla modulovať



cytokínmi, ako sú interleukín-3 (IL-3), interleukín-6 (IL-6), faktor stimulujúci kolónie granulocytov (G-CSF) a faktor stimulujúci kolónie makrofágov (M-CSF). Zistilo sa, že IL-1a, IL-3, TNF- $\alpha$  a G-CSF predpovedajú progresiu miernej kognitívnej poruchy na AD s 96 % presnosťou <sup>39</sup>. V amyloidových plakoch bola potvrdená prítomnosť ApoE, čím sa zvyšuje ich toxicita. V štúdií s protizápalovým indometacínom a antioxidačne pôsobiacim vitamínom E, ktoré boli podávané myšiam, došlo k poklesu hladiny A $\beta$  v mozgu. Prozápalové cytokíny spôsobujú zvýšenú tvorbu ApoE pôsobením na mikroglie a astrocyty, čo vedie k zvýšenej depozícii A $\beta$ . Po pridaní ApoE došlo k zníženej tvorbe NO-syntetázy a COX-2 enzýmu, čím sa potvrdzuje protizápalová aktivita ApoE4. Je však nutné uviesť, že pri absencii A $\beta$  a po pridaní ApoE došlo k tvorbe prozápalových cytokínov. Vedci uzavreli túto teóriu tým, že zápal nervového tkaniva je sám o sebe základnou etiológiou AD a nejedná sa len o sprievodný jav <sup>40</sup>.



Obr. 6 Tvorba amyloidných plakov <sup>41</sup>

### 3.3.1.7. Glykogénsyntáza kináza-3 $\beta$

Krvné doštičky obsahujú  $\tau$ -proteín a glykogénsyntázu kinázu-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Aktivita GSK-3 $\beta$  je v mozgu AD zvýšená, čo podporuje hyperfosforyláciu  $\tau$ -proteínu, ktorý je spojený s mikrotubulami a následne tvorí neurofibrilárne splete. V tejto súvislosti štúdie preukázali zvýšenú aktivitu GSK-3 $\beta$  v krvných doštičkách u pacientov s MCI a AD <sup>28</sup>.

### 3.3.1.8. Kalpain

Trombocyty majú všetky enzymatické mechanizmy spojené s APP a  $\tau$ - proteínmi, ako sú GSK-3 $\beta$  a  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretázy. Najvýznamnejšie aktivátory krvných doštičiek (trombín a kolagén), TxA<sub>2</sub>, cyklooxygenáza 1 (COX1) a PLCG2 sa podieľajú na produkcii A $\beta$ 40 doštičiek. Všetky tieto molekuly vedú k aktivácii kalpainu a potom k sekrécii A $\beta$  doštičkami. Kalpain patrí do rodiny proteínov závislých od vápnika a nelyzozomálnych cysteínových proteáz. Dva hlavné kalpains sú pomenované po koncentrácii vápnika (mikromolárnej a milimolárnej) potrebnej na *in vitro* aktiváciu. Jedná sa o kal-kalpain a m-kalpain, pričom m-kalpain je hlavným kalpainom v krvných doštičkách. Proteolýza a produkcia A $\beta$ 40 v lyzátoch doštičiek nastáva pôsobením  $\gamma$ -sekretázy. Ukázalo sa tiež, že táto proteolýza je úplne inhibovaná inhibítorom kalpainu a chelát intracelulárneho a extracelulárneho vápnika (EGTA). Na druhej strane sa ukázalo, že proteínkináza A (PKA) inhibuje motilitu fibroblastových buniek fosforyláciou m-kalpainu. Obe štúdie naznačujú možnú úlohu PKA na aktivitu kalpainu v krvných doštičkách. Špecifická úloha dráhy cAMP/PKA pri regulácii uvoľňovania A $\beta$  peptidu v krvných doštičkách nebola jasne objasnená. Zmes A $\beta$  peptidov rýchlo spôsobuje zvýšenie hladín kaspázy-3 s funkčnou inaktiváciou synapsií v neuronálnych bunkách a dokonca značne mieša peptidy A $\beta$ 38 s peptidmi A $\beta$ 40 a tým zvyšuje svoju toxicitu ešte viac ako toxicita peptidu A $\beta$ 42. Aktivované krvné doštičky napriek tomu prispievajú k viac ako 90 % cirkulujúceho A $\beta$ 40, akonáhle je v obehu, môže sa viazať na tri možné receptory na krvných doštičkách, ako napríklad PAR1, integrín  $\alpha_{IIb}\beta_3$  a receptor pre pokročilú glykáciu (RAGE). Aktivujú niekoľko signálnych dráh, indukujú zvýšenie intracelulárnej koncentrácie Ca<sup>2+</sup> doštičiek, ktoré stimulujú sekréciu  $\alpha$ -granúl. Stručne povedané, väzba peptidu A $\beta$ 40 na krvné doštičky podporuje sekréciu väčšieho množstva peptidu A $\beta$ 40, ktorý iniciuje začarovaný kruh aktivácie krvných doštičiek <sup>42</sup>. Nadmerná produkcia A $\beta$ 40 sa hromadí v mozgových cievach a hrá dôležitú úlohu v závažnosti

CAA a AD. Prípad RAGE je veľmi zaujímavý nakoľko je jeho expresia v endoteli hematoencefalickej bariéry dôležitá pri progresii AD. Sprostredkuje transport A $\beta$  do mozgu. Blokovanie jeho interakcie s A $\beta$  sa preto navrhlo ako terapeutický cieľ. Produkcia A $\beta$  40 v aktivovanej doštičke začína spracovaním APP sekretázami. Tieto enzýmy sú aktivované Ca<sup>2+</sup> a kalpainom. Použitím inhibítora kalpainu alebo EGTA sa produkcia A $\beta$ 40 zníži. Z testu agregácie krvných doštičiek, sa za optimálnu koncentráciu forskolínu, ktorá inhibuje agregáciu krvných doštičiek na 97,8 % považuje 20  $\mu$ M. To vedie k záveru, že forskolin (20  $\mu$ M) umožňuje inhibovať funkciu krvných doštičiek zvyšovaním hladín cAMP. V bazálnom stave má doštička vysoké hladiny APP, ktorá spracúva a vylučuje A $\beta$  peptid, keď je doštička stimulovaná agonistom, ako je trombín. Týmto spôsobom môžu doštičky zvyšovať plazmatické hladiny A $\beta$  a prispievať k rozvoju neurodegeneratívnych chorôb. Tento účinok sa môže zvrátiť, keď predinkubujeme trombocyty forskolínom. Inhibítory kalpainu sa použili na obnovenie synaptickej funkcie a zlepšenie pamäti vo zvieracích modeloch AD. V neuronálnych bunkách bolo opísané, že BACE1 interaguje cez svoju transmembránovú doménu s adenylátcyklázou, čo vedie k zníženiu hladín cAMP v bunkách a inaktivácii PKA. Cesta cAMP/PKA hrá kľúčové úlohy pri regulácii sekrécie A $\beta$  v ľudských doštičkách aspoň čiastočne kvôli inhibícii aktivity kalpainu <sup>42</sup>.

### 3.3.2. Farmakoterapia AD

Hlavným cieľom farmakoterapie je spomaliť prípadne stabilizovať kognitívne zhoršenie. Liečivá, ktoré sa v praxi používajú majú len symptomatický efekt na ochorenie.

Zo súčasnej farmakoterapie sú v ČR dostupné inhibítory cholinesteráz (IChE) (donepezil, rivastigmin, galantamin). Inhibujú AChE a butyrylcholinesterázu (BChE), vďaka čomu sa znižuje odbúravanie ACh. Je zároveň preukázané, že inhibíciou týchto enzýmov sa znižuje produkcia a toxicita A $\beta$  <sup>43</sup>. Huperzin A je alkaloid, ktorý vykazuje silné inhibičné účinky na AChE a v súčasnosti sa využíva pri liečbe AD v Číne. V niektorých štúdiách sa uvádza, že je účinnejší ako vyššie uvedené liečivá. Má lepšiu biologickú dostupnosť a lepšie preniká cez hematoencefalickú bariéru <sup>44</sup>. Ďalšou skupinou liečiv, ktoré sa používajú pri liečbe AD sú látky tlmiace excitotoxicitu (memantin). Sú určené pre liečbu už ťažších demencií <sup>43</sup>. Môže sa ordinovať pacientom, ktorí terapiu IChE netolerujú je u nich neúčinná alebo majú

kontraindikácie k IChE. Memantín blokuje *N*-methyl-D-aspartátové receptory, ktoré sú v dôsledku excitotoxicky pôsobiaceho glutamátu vo zvýšenej miere aktivované <sup>43</sup>.

Z novej liečebnej stratégie sa hľadajú účinné látky, ktoré by zasahovali do patológie AD a mali tak klinické uplatnenie. Antiamyloidná liečba u AD zabraňuje produkcii A $\beta$  ovplyvnením enzýmov, ktoré ho odštiepujú z APP. Hovoríme o inhibítoroch  $\beta$ -sekretáz a  $\gamma$ -sekretáz. S enantiomérom flurbiprofénu (NSAID), tarenflurbilom, sa dosiadlo sľubných výsledkov. Pri jeho užívaní dochádza z zníženej tvorbe A $\beta$  prostredníctvom modulácie  $\gamma$ -sekretázy a celkovo k zlepšeniu kognitívnych funkcií. Ďalšie potencionálne mechanizmy, ktoré by mali efekt na AD sú látky zvyšujúce solubilitu A $\beta$  ( glykosamintramiprosát), imunoterapia prostredníctvom monoklonálnych protilátok alebo látky, ktoré by zabraňovali agregácii <sup>43</sup>.

Testujú sa aj blokátory enzýmu GSK-3 $\beta$ , ktoré majú potenciál zabraňovať hyperfosforylácii a polymerizácii tau proteínu. Dimebolín, látka pôvodne patriaca medzi neselektívne antihistaminikum priaznivo ovplyvňuje neuronálne funkcie aj vďaka zlepšenému mitochondriálnemu metabolizmu. Moduluje glutamanergné receptory a pôsobí pozitívne pri ľahších a stredných foriem demencie. Aktivátory peroxizómového proliferáčného aktivačného receptora  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) účinkujú pozitívne pri demenciách tým, že zvyšujú citlivosť mozgového tkaniva k inzulínu. Znižuje sa zápalová reakcia a tvorba A $\beta$ . Ako aktivátory PPAR $\gamma$  sú skúšané antidiabetika (thiazolidindiony-rosiglitazon) <sup>45</sup>.

V terapii sú užívané aj farmaka, kde ich účinnosť nie je jasne podložená dôkazmi. Nootropika (piracetam, pyritinol, pentoxifylin, cinnarizin) sú látky, ktoré priaznivo pôsobia na pozornosť, pamäť, ovplyvňujú reológiu krvi, zvyšujú zásobovanie mozgu kyslíkom a glukózou <sup>46</sup>.

Vitamín E ( $\alpha$ -tokoferol) vykazuje priaznivé účinky pri súčasnom užívaní inhibítorov AChE v porovnaní s placebom. Znižuje oxidačné napätie pri AD a spomaľuje jej progresiu <sup>5</sup>. Rovnako aj iné antioxidanty ako kyselina lipoová či  $\beta$ -karotén slúžia ako prídavné liečivá no ich efekt nevykazuje dostatočné účinky <sup>44</sup>.

Štandardizovaný extrakt *Gingko Biloba L.* v mnohých štúdiách vykazuje priaznivé protizápalové, neuroprotektívne a antioxidačné vlastnosti a má potenciál v prevencii neurodegeneratívnych ochorení <sup>47</sup>.

Estrogény spôsobujú lepšie prekrvenie a vyživovanie mozgového tkaniva pôsobením na estrogénne receptory a hladkú svalovinu mozgových ciev. V štúdiách však ich terapeutické efekty neboli preukázané <sup>44</sup>.

Cerebrolyzin je hydrolyzát obsahujúci krátke peptidy a aminokyseliny. Pri produkcii nervových rastových buniek slúži ako prekursor no jeho účinky neboli dostatočne preukázané <sup>44</sup>.

### 3.4. Antiagregancia

Narušením celistvosti cievneho endotelu, prípadné poškodenie endotelu (fajčením, neliečenou cukrovkou, dlhodobým zvýšením krvného tlaku) dochádza k adhézii, aktivácii a neskoršej agregácii krvných doštičiek <sup>48</sup>.

Z hľadiska dostupnosti protidoštičkových liečiv môžeme inhibovať aktivačnú fázu krvných doštičiek, ktorá je sprostredkovaná  $\text{TxA}_2$  a ADP. Ďalšou možnosťou je zabránenie agregáčnej fázy doštičiek inhibíciou receptorov GP IIb/IIIa <sup>49</sup>.

#### 3.4.1. Kyselina acetylsalicylová

Najdlhšie používaným analgetikom, antiflogistikom, antipyretikom a taktiež finančne najmenej náročným protidoštičkovým liečivom. Za mechanizmus účinku sa považuje nezvratná blokáda COX, tiež označovaná ako prostaglandín syntáza. COX má dva izoenzýmy: tzv. konštitučná COX-1 a indukovaná COX-2. COX-1 nachádzajúca sa aj v trombocytoch je významná pre tvorbu prostaglandínu  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ), ktorý je východiskovou látkou pre syntézu  $\text{TxA}_2$ . Pri zápale hrá dôležitú úlohu COX-2 a vznikajúce prostaglandíny, ktoré zvyšujú citlivosť receptorov bolesti a týmto spôsobom podporujú zápalové reakcie a zvyšujú sa teplotu ľudského tela. COX-2 prítomná vo výstelke ciev je zodpovedná za tvorbu látok zo skupiny prostacyklínov  $\text{PGI}_2$ . Prostacyklíny majú schopnosť rozširovať cievy, zabraňujú adhézii krvných doštičiek a tým aj zrážaniu krvi <sup>49</sup>.

Ireverzibilná blokáda COX-1, trvá dovtedy kým sa nevytvoria nové trombocyty, čo je proces trvajúci 7–10 dní. Na tento efekt postačujú nižšie dávky kyseliny acetylsalicylovej (ASA) v rozmedzí 100–320 mg/deň <sup>46</sup>. S touto dlhodobou terapiou sa však spájajú aj nežiadúce poškodenia sliznice žalúdka až gastrointestinálne krvácania, na ktorom sa podieľa inhibícia COX-1 v žalúdočnej sliznici <sup>50</sup>. Avšak jej benefitný účinok s cieľom zabrániť uzáveru ciev zrazeninou prevyšuje tieto riziká a rutinná liečba je pre pacientov v rámci sekundárnej prevencie ischemických chorôb srdечných a akútnych koronárnych príhod vysoko prospešná <sup>49</sup>. V rámci prevencie máme na slovenskom trhu k dispozícii ASA pod výrobnými názvami ANOPYRIN, ASPIRIN PROTECT, CARSAXA, GERASA, PREVENTAX, STADAPYRIN, VASOPIRIN <sup>51</sup>.

### 3.4.2. Blokátory ADP receptorov

Blokátory ADP receptorov pôsobia mechanizmom zabránenia aktivácie krvných doštičiek a to väzbou na špecifické miesta na povrchu trombocytov. ADP interaguje s 2 rôznymi purinergnými receptormi na krvných doštičkách známe ako P2Y1 a P2Y12. Sú to 2 receptory z celkových siedmich transmembránových receptorových tried. Interakcia s P2Y1 iniciuje odozvu trombocytov zatiaľ čo interakcia s P2Y12 podporuje odozvu. Blokádou účinku ADP na niektorý z týchto receptorov vedie k výraznému zníženiu celkového účinku ADP na trombocyty. Počiatočnou odpoveďou na ADP je zmena tvaru krvnej doštičky na sférický tvar so pseudopódiami. Táto zmena tvaru je sprostredkovaná receptorom P2Y1, influxom  $\text{Ca}^{2+}$  iónov, intracelulárnou mobilizáciou  $\text{Ca}^{2+}$  a polymerizáciou aktínu. Interakcia ADP s P2Y12 vedie k inhibícii adenylátcyklázy, ktorá je sprevádzaná agregáciou krvných doštičiek. Do tejto skupiny antiagregancií zaraďujeme účinné látky ako tiklopidín, klopido-rel, prasugrel, tikagrelor, kangrelor<sup>52</sup>.

Tiklopidín ako prvý používaný z tejto skupiny liečiv sa kôli svojmu závažnému nežiadúcemu účinku a to nedostatku krvných doštičiek a následnému zvýšenému krvácaniu už skoro nepoužíva<sup>49</sup>.

Klopido-rel je potrebné pred svojím účinkom aktivovať pretože je dostupný ako neaktívne proliečivo. Pro svoj antiagregačný účinok sa musí metabolizovať v 2 hlavných metabolických cestách v pečeni na aktívny formu. Aktívny metabolit je tvorený rodinou cytochrómu P450 (CYP2C19). Tu nastáva problém, pretože niektoré enzýmy z tejto skupiny sú geneticky polymorfné a zároveň pri užívaní viacerých liečiv súčasne môžu spolu interagovať, čo sa vo výsledku prejaví ako nedostatočná odpoveď. Z bezpečnostného hľadiska je preto potrebné zabrániť súbežnému podávaniu silných alebo stredne silných inhibítorov. Ako príklad sem môžeme zaradiť omeprazol, fluvoxamín, fluoxetín, moklobemid, vorikonazol, flukonazol, tiklopidín, karbamazepin, vorikonazol, efavirenz<sup>49</sup>. Thienopyridínový derivát sa nevratne viaže na receptory P2Y12, čo spôsobuje, že receptor nie je schopný reagovať na ADP, čím sa znižuje funkcia krvných doštičiek. Nezvratný účinok na receptor P2Y12 je dôsledkom kovalentnej väzby na cysteínové sulfohydroxylové zvyšky v receptore. Jeho účinok na funkciu krvných doštičiek trvá počas celej životnosti doštičiek a to 7–10 dní<sup>52</sup>. Udržiavacia dávka klopido-relu

je 75 mg s nástupom účinku 2–6 hodín podávaný v jednodňovej dávke <sup>49</sup>. V terapii či prevencii aterotrombotických príhod prípadne tromboembolických príhod s fibriláciou predsiení používame Zyllt, Trombex, Plovtt, Clopigamma, Clopidogrel Actavis/Mylan/Teva <sup>53</sup>.

Prasugrel je rovnako ako klopidoogrel thienopiridínový derivát. Proliečivo vyžaduje metabolickú biokonverziu pomocou cytochrómu P450. Preto je potrebné zvýšiť pozornosť k interakciám s SSRI, TCA,  $\beta$ -blokátormi. Taktiež boli pozorované zvýšené riziká krvácania u pacientov vo veku nad 75 rokov s váhou pod 60 kg a s prekonanou cievnu mozgovou príhodou či tranzitórnymi ischemickými atakmi <sup>54</sup>. Pokiaľ je nutné, podávanie prasugrelu za týchto okolností sa uprednostňuje podávanie 5mg/deň, inak je bežná udržiavacia dávka 10mg/deň. Trombocyty sú reaktivované už za 7 dní po ukončení liečby. Vďaka rýchlej metabolizácii pečevnými enzýmami má nástup účinku už po 30 minútach <sup>49</sup>. V anti-agregačnej terapii sa môžeme stretnúť s prasugrelom pod výrobnými názvami Bewim, Efient a Sigrada <sup>55</sup>.

Tikagrelol taktiež interaguje s receptormi doštičiek P2Y<sub>12</sub>, čo ich robí neschopnými interagovať s ADP. Z chemického hľadiska je to cyklopentyltriazolopyrimidín, nejedná sa teda o thienopyridínový derivát. V tomto prípade však nevyžaduje metabolickú konverziu, aby interagoval s receptorom, čo môže aspoň čiastočne zodpovedať vyššej účinnosti v porovnaní s klopidoogrelom bez ohľadu na genetické rozdiely v aktivite enzýmov. Jeho účinok nie je ireverzibilný takže akonáhle je jeho koncentrácia v krvi znížená už nedokáže inhibovať funkciu doštičiek <sup>52</sup>. V porovnaní s klopidoogrelom je tikagrelol úspešnejší v znižovaní kardiovaskulárnych príhod v 12 mesačnej terapii u pacientov s akútnym infarktom myokardu. Udržiavacia dávka tikagrelolu je 90 mg 2x denne <sup>49</sup>. Obnovenie aktivity trombocytov je už behom 3–5 dní. Tikagrelol je účinnou látkou liečivého prípravku Brilique <sup>56</sup>.

Kangrelol je priami, reverzibilný inhibítor ADP receptorov P2Y<sub>12</sub>, analóg ATP. Z tejto skupiny je jediným liečivom podávaným vnútrožilne 4 $\mu$ g/kg s dosiahnutím maximálnej inhibície trombocytov do 30 minút <sup>54</sup>. Po ukončení infúzie efekt pretrváva ešte 60 minút. Rovnako ako tikagrelol aj kangrelol sa spomalením vychytávania ADP môže prejavíť v epizódach dýchavičnosti. Indikácia kangrelolu je u pacientov s akútnymi koronárnymi syndrómami s neschopnosť perorálneho podania <sup>57</sup>.



### 3.4.3. Inhibítory glykoproteínových receptorov II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub>

Glykoproteínový receptor II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> je na vápniku závislý heterodimér a skladá sa z  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Jednotka GP III<sub>a</sub> sa viaže na sekvenciu 4 aminokyselín a je dôležitá pre fibrinogén či iný ligand. Pre túto sekvenciu je charakteristický vždy stabilný reťazec 3 aminokyselín, takzvaná RGD sekvencia, kde 4 aminokyselina sa môže meniť. Inhibítory týchto receptorov tak napodobňujú túto sekvenciu aminokyselín a zabraňujú väzbe fibrinogénu a vytvoreniu fibrínovej siete<sup>57</sup>. K dispozícii sú účinné látky výhradne podávané parenterálne. Ich využitie je vyhradené pre pacientov pri perkutánnej koronárnej vazodilatácii a pri nestabilnej angine pectoris<sup>48</sup>.

Abciximab je monoklonálna protilátka pomaly rozložiteľná proteázami a patriaca medzi nekompetitívnych inhibítorov. Po skončení podávania sa jeho účinky prejavujú naďalej po dobu 6–12 hodín<sup>49</sup>. Okrem antiagregačného účinku má efekt aj antikoagulačný a to pravdepodobne inhibíciou tvorby trombínu<sup>58</sup>.

Eptifibatid patrí do skupiny kompetitívnych inhibítorov s vysokou afinitou na GP II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> receptor. Z chemického hľadiska sa jedná o cyklický heptapeptid. Miesto arginínu má vo svojej štruktúre lyzín a vytvára tripeptidovú sekvenciu lyzín-glycín-aspartát (KGD sekvencia), s ktorou napodobňuje RGD sekvenciu.<sup>57</sup> Účinky eptifibatidu pretrvávajú po ukončení infúzie ešte 2–4 hodiny. Je vylučovaný prevažne obličkami, takže pri problémoch s renálnou elimináciou eptifibatidu je možné pozorovať efekt až po dobu 6 hodín<sup>49</sup>.

Tirofiban je nízkomolekulárny nepeptidový derivát tyrozínu, ktorý sa viaže reverzibilne na RGD sekvenciu GP II<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> receptora<sup>57</sup>. Účinky tohto liečiva po ukončení podávania infúzie pretrvávajú 2–4 hodiny<sup>49</sup>.

### 3.4.4. Účinné látky s antiagregačnou aktivitou

Medzi ďalšie liečivá s preukázanou antiagregačnou aktivitou používané v terapii podľa ATC klasifikácie zaradujeme cilostazol, indobufén, treprostinil, iloprost<sup>59</sup>.

Cilostazol patrí do skupiny liečiv s dvojitým mechanizmom účinku. Inhibuje fosfodiesterázu typu 3, znižuje degradáciu cAMP, cGMP a tým stabilizuje a znižuje odpoveď trombocytov na aktivačné podnety. Zároveň pôsobí na hladkú svalovinu ciev vazodilatačne<sup>60</sup>. Druhým mechanizmom účinku je inhibícia spätného vychytávania ADP inhibíciou ENT-1

transportéru, čo má synergický účinok na výsledný efekt. Cilostazol (Cilozek) sa podáva pacientom s ischemickou chorobou dolných končatín s nedostatočnou kompenzáciou klaudikácií. Jeho benefitom však je, že zatiaľ čo pôsobí na  $\alpha$ -2 receptory v cievach zvýšením cAMP, na  $\alpha$ -1 receptory pôsobí opačným účinkom, teda inhibuje adenylátcyklázu a tým zabraňuje konverzii ATP na cAMP<sup>59, 60</sup>.

Indobufén reverzibilne blokuje doštičkovú COX a tak inhibuje produkciu TxA<sub>2</sub>. Ibustrin s obsahom tejto účinnej látky je indikovaný pri patologických stavov, ako je napríklad náhla cievna mozgová príhoda, tranzitórne ischemické ataky, ochorenie periférnych tepien aterosklerotického pôvodu, prípadne v profylaxii tromboembolických príhod u pacientov<sup>59, 61</sup>.

Iloprost a treprostinil sú syntetické analógy prostacyklínu, ktoré sú inhibítormi fosfodiesterázy typu 5 a antagonistami endoteliálneho receptora, čím vykazujú vazodilatačné aj antiagregačné vlastnosti zabraňujúce adhézii krvných doštičiek k cievnej stene. Pod názvom Ventavis (Iloprost) v liekovej forme ako roztok na rozprašovanie aplikovaný inhalačne a Remodulin (Treprostinil), ktorý sa aplikuje subkutánne alebo intravenózne sú indikované pacientom s primárnou pľúcnou hypertenziou<sup>59, 62, 63</sup>.

### 3.5. Alkaloidy s antiagregačnou aktivitou

V tejto kapitole si uvedieme významných zástupcov rastlín s obsahom alkaloidov s protidoštičkovou aktivitou, ktoré si rozoberieme na základe ich štruktúrnych typov. Alkaloidy sú malé organické molekuly, sekundárne metabolity rastlín, obvykle obsahujúce dusík v kruhu. Približne 20 % rastlinných druhov tvoria alkaloidy. Z protidoštičkových činidiel sa používa niekoľko typov alkaloidov <sup>64</sup>.

Rutekarpin, alkaloid izolovaný z *Evodia rutaecarpa* C.C. Huang, vykazuje významnú protidoštičkovú aktivitu, ktorá je ďalej zvýšená jeho derivátmi: 2,3-metylendioxyrutakarpinom, 3-chlororutakarpinom a 3-hydroxyrutakarpinom. Táto zmena aktivity sa prisúdila substitúcii hydroxylových a metoxyskupín. Z *Piper longum* L. sa izolovali štyri amidy kyselín (piperin, pipernonalin, piperoktadekalidin a piperlongumin), ktoré vykazujú protidoštičkový účinok v závislosti od koncentrácie. Piperlongumin je najúčinnnejším izolátom a pôsobí inhibične na agregáciu indukovanú kolagénom, AA a faktorom aktivujúcim doštičky (PAF). Ďalším zdrojom alkaloidov je rastlina *Veratrum dahuricum* (Turcz.) O. Loes a z nej antiagregačne účinný veratroylgermin. Zistilo sa, že táto zlúčenina vykazuje najsilnejšiu inhibíciu agregácie krvných doštičiek indukovanú AA s inhibičnou rýchlosťou 92,0 % pri 100 µM. Zo *Spiraea japonica* L.f. sa izoloval spiraminu C1, ktorý inhibuje PAF, ADP, AA indukovanú agregáciu krvných doštičiek v závislosti od koncentrácie. Inhibičný účinok spomínanej zlúčeniny na AA bol porovnateľný s inhibičným účinkom ASA <sup>64</sup>.

β-Karbolínové alkaloidy získané z *Peganum harmala* L. majú dobrú protidoštičkovú aktivitu. Z izolovaných β-karbolínových alkaloidov sú najsilnejšie harman a harmin alkaloidy. Leonurin izolovaný z nadzemnej časti *Leonurus sibircus* L. významne inhibuje agregáciu doštičiek indukovanú trombínom, AA a kolagénom. *Cassytha filiformis* L. obsahuje katafilin, kataformin, aktinodafnin, predicentrin a okotein. Tieto alkaloidy vykazujú pozoruhodné vazorelaxačné a inhibičné účinky na agregáciu krvných doštičiek v premytých králičích doštičkách indukovaných pomocou ADP, AA, kolagénom a PAF. Kôra kmeňa *Hernandia nymphaeolia* (J.Presl) Kubitzki má silnú antiagregačnú aktivitu *in vitro* v dôsledku prítomnosti šiestich alkaloidov: laurotetaninu, oxohernaginu, tallikapinu, retikulinu, vateaminu a hernandalinu. Ajmalín a acetylajmalín prítomné ako minoritné alkaloidy v *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth.ex Kurz, selektívne inhibujú agregáciu indukovanú PAF <sup>64</sup>.

*Ruta graveolens* L., rastlina, ktorá patrí do čeľade Rutaceae, odhalila prítomnosť diktaminu, chalepenzinu, klausindinu a hrobolinu, ktoré vykazujú významnú inhibíciu agregácie krvných doštičiek. Chinolínové alkaloidy z kôry koreňa *Melicope semecarpifolia* (Merr.) T.G. Hartley vykazujú významnú inhibíciu krvných doštičiek proti agregácii indukovanej AA, kolagénom a PAF <sup>64</sup>.

## ANTIAGREGAČNÝ MECHANIZMUS RASTLINNÝCH ALKALOIDOV

Boli navrhnuté rôzne mechanizmy protidoštičkovej aktivity izolovaných rastlinných alkaloidov. Napríklad berberin významne inhibuje agregáciu krvných doštičiek inhibíciou syntézy TxA<sub>2</sub> indukovaného ADP, AA, kolagénom. Klausin-D izolovaný z *Clausena excavata* Burm.f., vykazuje protidoštičkový účinok inhibíciou tvorby TxA<sub>2</sub>. Vyššia koncentrácia tohto alkaloidu (150 µM) vedie k takmer úplnej inhibícii agregácie krvných doštičiek vyvolanej kolagénom. Podobne hernandalin a apomorfínové alkaloidy vykazujú protidoštičkovú aktivitu úplnou inhibíciou agregácie trombocytov indukovanej PAF pri 50 µg/ml, zatiaľ čo retikulin úplne inhibuje agregáciu trombocytov indukovaných AA a kolagénom. β-Karbolínové alkaloidy selektívne inhibujú PLCG2 a proteínovú tyrozínovú fosforyláciu s postupným potlačením mobilizácie cytosolického Ca<sup>2+</sup> a uvoľňovaním AA čo naznačuje, že harman a harmin majú potenciál vyvinúť sa ako nové činidlá pre aterotrombotické ochorenia <sup>64</sup>. Medzi ďalšie mechanizmy protidoštičkového pôsobenia prírodných produktov zaraďujeme aj signálnu dráhu PPAR a inhibíciu exprese P-selektínu doštičiek prostredníctvom cAMP. PPAR sa skladá z troch izoforiem jadrového receptora. Sú kľúčovými regulátormi metabolického syndrómu a hrajú dôležitú úlohu v procesoch, ktoré riadia chronické zápalové ochorenia, modulujú vývoj aterosklerózy pôsobením na metabolickej aj vaskulárnej úrovni. PPAR sa nachádza v ľudských doštičkách a v tejto súvislosti sa zdá, že PPAR hrá hlavnú úlohu v regulácii aterogenézy, pôsobením proti zápalu vyvolávajúcemu adhéziu a aktiváciu krvných doštičiek. Mechanizmus aktivácie protidoštičkového účinku prírodných produktov ako agonistov PPAR a zvyšovanie hladín cAMP vo vnútri doštičiek je sprostredkovaný nasledujúcimi signálnymi cestami <sup>65</sup>:

1. inhibícia PCK-α/zvýšenie hladín cAMP/stimulácia PKA
2. stimulácia Akt/NOS/NO/PKG (zvýšenie hladín cGMP)
3. inhibícia COX-1, TxA<sub>2</sub>, mobilizácia Ca<sup>2+</sup>

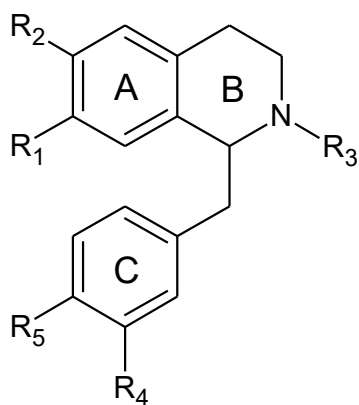
Opíšeme si jeden z možných mechanizmov pôsobenia prírodných produktov na expresiu doštičiek P-selektínu prostredníctvom cAMP. Sanguinarin, alkaloid prítomný v koreňoch *Sanguinaria canadensis* L. je silným protidoštičkovým účinkom, ktorý aktivuje adenylátcyklázu a tým produkciu cAMP. Inhibuje mobilizáciu  $\text{Ca}^{2+}$  v trombocytoch a produkciu  $\text{TxA}_2$ . Potláča aktivitu enzýmov COX-1, zatiaľ čo jeho účinok na aktivitu COX-2 je minimálny. Podobné protidoštičkové účinky má girinimbin, ktorý vykazuje inhibíciu aktivity COX a zvýšenie hladiny cAMP. Zvýšenie hladín cAMP vo vnútri doštičiek preukazuje, že dicentrin a girinimbin môžu inhibovať expresiu P-selektínu. Vzťah medzi hladinami cAMP a expresiou P-selektínu je prisudzovaný tomu, že cAMP prostredníctvom aktivácie PKA je schopný inhibovať expresiu doštičiek P-selektínu <sup>65</sup>.

### **3.5.1. Alkaloidy odvodené od tyrozínu a fenylalanínu**

#### **3.5.1.1. Isochinolínové alkaloidy**

Je to skupina s veľmi početnými zástupcami. Medzi isochinolínové alkaloidy zaraďujeme alkaloidy patriace do rôznych štruktúrnych typov: tetrahydroisochinolínový typ, aporfínový typ, protoberberínový typ, morfinanový typ, benzofenanthridínový typ a ďalšie. Ich štruktúra pozostáva z jednej alebo dvoch fenylalanínových respektíve tyrozínových molekúl <sup>66</sup>. Uvedieme si niekoľkých významných zástupcov rastlín z tejto skupiny alkaloidov s potenciálnym antiagregačným a zároveň aj vazorelaxačným efektom.

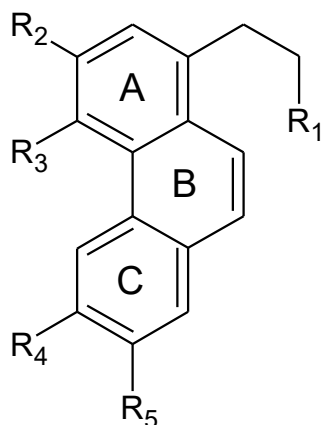
Ako prvé si uvedieme fenanthrénové a benzyloisochinolínové alkaloidy získané z rastlín čeľade Annonaceae a Lauraceae. Testovali sa ich protidoštičkové a vazorelaxačné účinky a zároveň cieľom tejto štúdie bolo objasniť ich vzťah medzi štruktúrou príslušných alkaloidov a aktivitou na krvné doštičky <sup>67</sup>.



**Obr.7 Benzylisochinolínová štruktúra alkaloidov**

**Tab.5 Zástupcovia benzylisochinolínových alkaloidov** <sup>67</sup>

Alkaloidy	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
(±)- <i>N</i> -methylkoklaurin ( <b>1</b> )	OH	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH
(+)- <i>N</i> -norarmepavin ( <b>2</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH
(+)-retikulín ( <b>3</b> )	OH	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
(+)-laudanidín ( <b>4</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
(±)- <i>N</i> -norarmepavin ( <b>5</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH
(±)-koklaurín ( <b>6</b> )	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH
(-)- <i>N</i> -norarmepavin ( <b>7</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH
(-)-magnokurarín ( <b>8</b> )	OH	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> I-	H	OH
(-)- <i>O</i> -methyl- <i>N</i> -norarmepavin ( <b>9</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>
(+)- <i>O</i> -methyl- <i>N</i> -norarmepavin ( <b>10</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OCH <sub>3</sub>
(+)-armepavin ( <b>11</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH
(+)-armepavinium ( <b>12</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH
(+)-armepavin metyljodid ( <b>13</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> I-	H	OH
(-)-laudanósín ( <b>14</b> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



**Obr.8 Fenanthrénová štruktúra alkaloidov**

**Tab.6 Zástupcovia fenanthrénových alkaloidov** <sup>67</sup>

Alkaloidy	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
atherosperminin chloristan ( <b>15</b> )	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
atherosperminium jodid ( <b>16</b> )	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
dicentrin methin ( <b>17</b> )	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
xylopin hydroxylamin ( <b>18</b> )	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O	H	OCH <sub>3</sub>
atherosperminin- <i>N</i> -oxid ( <b>19</b> )	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O <sup>-</sup>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
glaucin methin- <i>N</i> -oxid ( <b>20</b> )	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> O <sup>-</sup>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Pri štúdiu boli použité krvné doštičky v ktorých bola agregácia indukovaná ADP (20 μM), AA (100 μM), kolagénom (10 μM/mL) a PAF (2 ng/mL). Z výsledkov, ktoré nám prináša príslušná štúdia vyplýva, že zlúčeniny **15** a **16** pri koncentrácii 100 μg/ml, úplne inhibovali agregáciu trombocytov indukovaných všetkými štyrmi činidlami (ADP, AA, kolagén a PAF). Zlúčeniny **1**, **18** a **19** boli silnými inhibítormi agregácie trombocytov indukovaných AA a kolagénom, ale nie inhibítormi indukovanými ADP alebo PAF <sup>67</sup>. Zlúčenina **6** vykázala úplnú inhibíciu agregácie trombocytov indukovanej AA, zlúčenina **17** bola silnejším inhibítorom agregácie indukovanej kolagénom, zatiaľ čo zlúčenina **8** bola účinnejšia v inhibícii agregácie

indukovanej PAF. Zlúčeniny **2, 3, 5, 7, 11, 13** a **20** vykazovali slabú, ale významnú inhibíciu agregácie krvných doštičiek spôsobenú rovnakými induktormi. ASA sa použila ako referenčná kontrola a úplne inhibovala agregáciu krvných doštičiek indukovanú AA. Z dosiahnutých výsledkov bolo možné vyvodiť nasledujúce závery súvisiace s protidoštičkovou aktivitou. 1,2,10-oxygenované sekundárne alebo terciárne benzylozochinolínové alkaloidy obsahujúce dve hydroxylové skupiny na C-1 a C-10 kruhoch A a C, napríklad zlúčenina **1**, preukázali inhibíciu agregácie krvných doštičiek spôsobenú AA a kolagénom. Pokiaľ hydroxylová skupina na C-1 alebo C-1 a C-10 1,2,10-oxygenovaných benzylozochinolínových alkaloidov bola konvertovaná metylovou skupinou ako v prípade zlúčeniny **13** alebo konvertovaná na dve metoxyskupiny ako v zlúčenine **9** boli znížené protidoštičkové účinky. Modifikácia 3,4-oxygenovaných terciárnych fenanthrénových alkaloidov na *N*-oxidy ako je to v prípade zlúčenín **15** a **19**, mali za následok zníženie protidoštičkových účinkov. 3,4-Oxygenované terciárne alebo kvartérne fenanthrénové alkaloidy obsahujúce dva atómy vodíka na C-6 a C-7 v kruhu C ako v zlúčeninách **15** a **16** viedli k najsilnejšej inhibícii agregácie krvných doštičiek medzi týmito alkaloidmi. Ak sa atómy vodíka v kruhu C-6 alebo C-7 v kruhu C 3,4-oxygenovaných fenanthrénových alkaloidov prevedú na jednu alebo dve metoxyskupiny ako je to v zlúčeninách **18, 17**, a **20** protidoštičkové účinky poklesli. Protidoštičkové účinky fenanthrénov boli medzi testovanými zlúčeninami účinnejšie ako účinky benzylozochinolínových alkaloidov <sup>67</sup>.

Z *Piper mullesua* Buch.-Ham.ex D.Don z čelade Piperaceae boli izolované dva izochinolínové alkaloidy – pipermullesiny B (**1**) a C (**2**). Rod *Piper* je medicínsky dôležitá skupina rastlín, ktorá pozostáva z približne 2 000 druhov na celom svete. V tropických oblastiach Číny je distribuovaných približne 60 druhov, z ktorých približne 30 druhov sa používa v tradičnej čínskej medicíne. Niektoré druhy *Piper* sa používajú na podporu krvného obehu, zatiaľ čo *P. mullesua* sa používajú na odstránenie krvnej fázy. *P. mullesua* sa tiež používa na liečbu krvácania, zranení z pádov, reumatoidnej artritídy, reumatickej artralgie, akroanestézie, astmy, prechladnutia, bolesti brucha, bolesti zubov, opuchov, dysmenorey a uštipnutia hadom a hmyzom. Izoláty boli hodnotené z hľadiska inhibičnej aktivity proti agregácii krvných doštičiek indukovanej trombínom alebo PAF <sup>68</sup>.



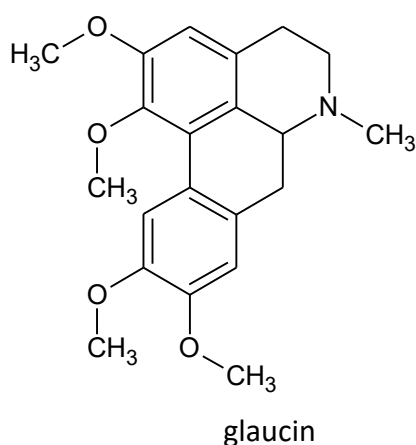
Extrakt z *P. mullesua* vykazovali aktivitu proti agregácii doštičiek indukovanej PAF s hodnotou  $IC_{50} = 64,43 \mu\text{g/ml}$ . Zlúčeniny **1** a **2** vykazovali inhibičné účinky na agregáciu králičích doštičiek indukovaných trombínom <sup>68</sup>.

V ďalšej štúdii sa štyridsaťjeden izochinolínových alkaloidov testovalo na inhibíciu agregácie krvných doštičiek. Uvedieme si len významných zástupcov ako sú: diskretamin (**1**), protopin (**2**), ( $\pm$ )-karyachin (**3**) ochotensimin (**4**), *O*-metylarmepavinemetin (**5**), lindoldamin (**6**), izotetrandrin (**7**), talikarpin (**8**), papaverin (**9**) a (+)-*N*-norarmepavin (**10**). Izochinolínové alkaloidy sú známe tým, že vykazujú početné biologické aktivity. Boli študované vďaka ich účinkom na agregáciu premytých králičích doštičiek indukovaných ADP (20  $\mu\text{M}$ ), AA (100  $\mu\text{M}$ ), kolagénom (10  $\mu\text{g/ml}$ ) a PAF (2 ng/ml). Zlúčenina **1** má odlišný štruktúrny skelet ako ASA, ale vykazuje aktivitu ako ASA. Presný mechanizmus je však potrebné ešte preskúmať. Fenolové skupiny môžu hrať dôležitú úlohu v aktivite, pretože keď sa hydroxylové skupiny C-3 a C-10 v štruktúre zlúčeniny **1** zmenili na dve metoxylové skupiny, protidoštičkové účinky sa eliminovali. Zlúčenina **2**, ktorá obsahuje metylendioxy skupinu na C-9 a C-10, úplne inhibovala kolagénom a PAF-indukovanú agregáciu a významne predchádzala agregácii indukovanej AA. Modifikáciou metylendioxy funkčných skupín na dve metoxyskupiny sa úplne zrušila protidoštičková aktivita. Spomedzi spomínaných alkaloidov, iba zlúčenina **3** vykazovala významnú inhibíciu agregácie trombocytov indukovanú kolagénom. Ak bola hydroxyskupina v polohe C-8 zlúčeniny **3** premenená na metoxyskupinu neboli pozorované žiadne protidoštičkové účinky. Testovali sa tiež neobvyklé spirobenzylizochinolíny. Medzi nimi zlúčenina **4**, ktorá má *exo*-metylénovú skupinu v polohe C-13, preukázala vynikajúcu aktivitu proti agregácii krvných doštičiek indukovanú PAF. Premena metylénovej skupiny na metylovú skupinu eliminovala protidoštičkovú aktivitu. Stilbenové alkaloidy boli účinné proti agregácii krvných doštičiek vyvolanej ADP, AA, kolagénom a PAF. Spomedzi nich bola najsilnejšia zlúčenina **5**, ktorá úplne inhibovala agregáciu trombocytov indukovanú všetkými štyrmi aktivátormi. Zmenou bázy typu stilbénu na metyljodidovú soľ prípadne konverzia C-5,4'-dimetoxyskupín na C-5,4'-dietoxyskupiny sa znížili protidoštičkové účinky. Spomedzi série bisbenzylizochinolínových alkaloidov, zlúčenina **6** úplne inhibovala agregáciu trombocytov indukovanú AA, kolagénom, PAF a významne inhibovala ADP <sup>69</sup>. Na druhej strane zlúčenina **7** kompletne inhibovala agregáciu trombocytov indukovanú AA a kolagénom, zatiaľ

čo zlúčenina **8** len čiastočne inhibovala agregáciu trombocytov indukovanú kolagénom, AA a PAF. Ďalej v triede benzylozochinolínových alkaloidov, zlúčenina **9** vykazovala širokú škálu antiagregačných účinkov. Ďalším aktívnym členom tejto triedy je zlúčenina **10**, ktorá vykazovala silnú inhibíciu agregácie indukovanej ADP, AA a kolagénom. Okrem toho agregácia krvných doštičiek vyvolaná kolagénom bola kompletne inhibovaná zlúčeninou **5**. Benzylozochinolínový alkaloid **9**, ktorý má štyri metoxyskupiny na C-6, 7, 3', 4', vykazoval silnú inhibíciu agregácie trombocytov. Modifikáciou *N*-metylbenzyltetrahydroizochinolínu sa však znížila protidoštičková aktivita. Nasýtenie benzylozochinolínového kruhu B taktiež prudko znížilo protidoštičkové aktivity. Medzi všetkými skúmanými štruktúrnymi typmi niektoré zlúčeniny, napr. **5** a **9**, vykazovali silné protidoštičkové účinky proti agregácii indukovanej všetkými štyrmi aktivátormi. Zlúčeniny **4** a **10** naopak vykazovali vysoko selektívnu inhibíciu voči špecifickým cieľom. Vo všeobecnosti, malá zmena v štruktúre rôznych podtypov izochinolínov spôsobuje významné zmeny v aktivácii agregácie krvných doštičiek <sup>69</sup>.

#### 3.5.1.1.1. Aporfínové alkaloidy

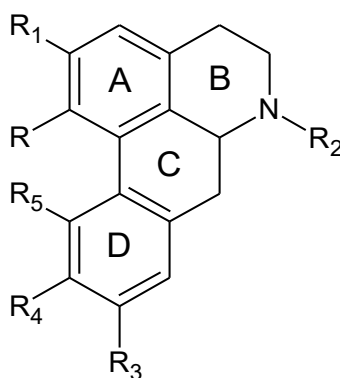
Významnou skupinou sú aj aporfínové alkaloidy. Rastlina *Corydalis yanhusuo* (Y.H. Chou & Chun C. Hsu) W.T. Wang ex Z.Y. Su & C.Y. Wu z čeľade Papaveraceae sa používa v tradičnej medicíne na liečenie kardiovaskulárnych chorôb. Obsahuje aporfínový alkaloid glaucin (**1**) <sup>70</sup>. Patria medzi alkaloidy vznikajúce z (*S*)-retikulínu <sup>71</sup>.



**Obr.9 Štruktúra aporfínového alkaloidu**

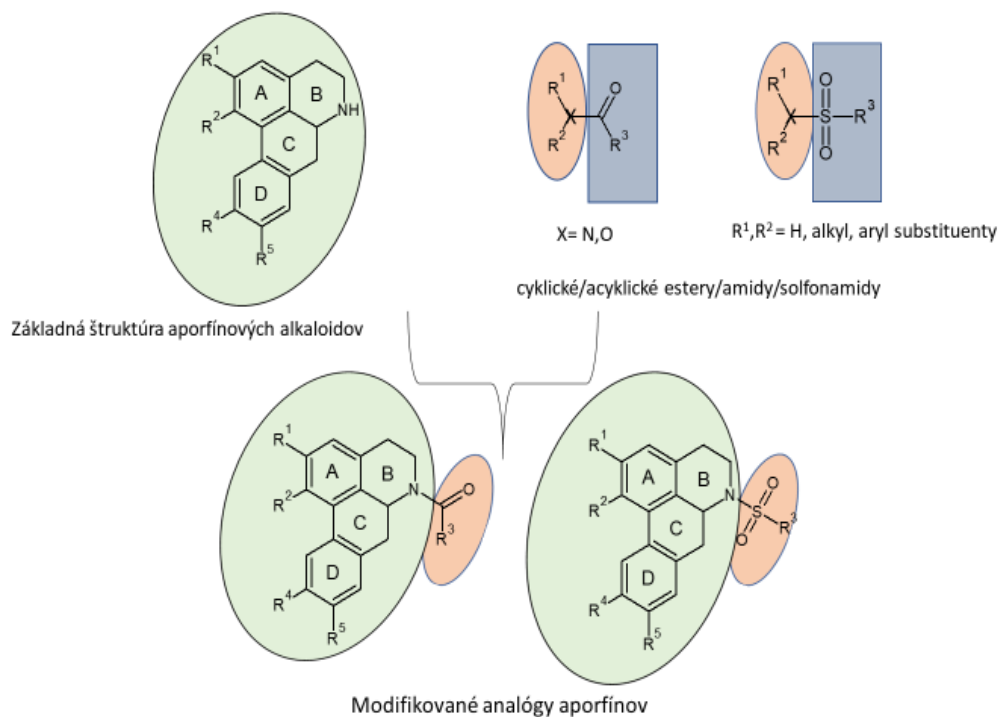
Výsledky naznačujú, že alkaloid **1** môže inhibovať agregáciu trombocytov vyvolanú trombínom v nízkej dávke ( $IC_{50} = 49,06 \mu g/ml$ ) v porovnaní s totálnym alkaloidným extraktom ( $IC_{50} = 175,43 \mu g/ml$ ) a ASA ( $IC_{50} = 300,34 \mu g/ml$ ). Ako jeden z najsilnejších agonistov doštičiek sa trombín použil na vyvolanie agregácie krvných doštičiek. Obsahové zlúčeniny podzemku rastliny *C. yanhusuo* sa môžu špecificky viazať na povrch membrány doštičiek prostredníctvom kovalentných väzieb, elektrostatických interakcií, hydrofóbných interakcií a vodíkových väzieb <sup>70</sup>.

1,2,3,4-tetrahydroizochinolínová podštruktúra je prítomná v základnom tetracyklickom vzorci aporfínových alkaloidov. Veľký počet aporfínových alkaloidov sa izoloval z niekoľkých druhov rastlín (napr. Hernandiaceae, Lauraceae, Annonaceae atď.). Prírodné/syntetické aporfíny boli identifikované pre svoje antimikrobiálne a antivírusové vlastnosti. Patria medzi inhibítory AChE, sú ligandmi receptorov pre centrálny nervový systém, látkami proti AD a inými agonistami dopamínu D1/D2. Navyše ich charakteristický tetracyklický motív s rôznymi hladinami oxidácie na oboch aromatických kruhoch vedie k širokému spektru zaujímavých biologických aktivít, vrátane antimalarických, serotoninergných, protirakovinových, vazorelaxujúcich, cytotoxických. Prírodné a polosyntetické aporfínany vykazujú antioxidačné a protidoštičkové účinky. Cyklické/acyklické/amidové analógy a sulfónamidové analógy vykazujú sľubné antioxidačné protidoštičkové účinky (napr. ASA, tirofiban, sulfinpyrazón, klopidoogrel) <sup>72</sup>.



**Obr.10 Základná štruktúra aporfínových analógov**

Vedci verili, že kombináciou týchto dvoch skupín, môžu vykazovať sľubné protidoštičkové a antioxidačné aktivity a preto sa navrhli nové analógy aporfínov. Podliehajú štruktúrnej modifikácii v polohách C1/C2 na kruhu A a v amidových/sulfónamidových funkčných skupinách v polohe N6 v kruhu B <sup>72</sup>.

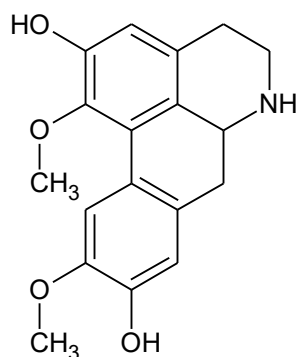


**Obr.11 Štruktúrna modifikácia aporfínových alkaloidov**

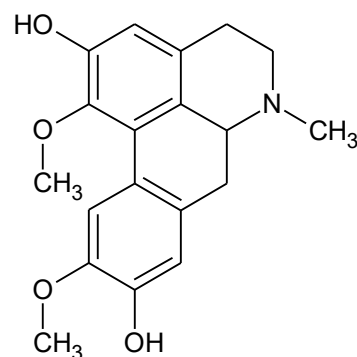
Možno interpretovať, že *N*-acetylový analóg aporfínov vykazoval lepšiu inhibičnú aktivitu voči agregácii krvných doštičiek ako *N*-sulfónamidové analógy. Alkoxy substituenty v polohách C1 a C2 kruhu A a substituent na N6 sa môžu modifikovať tak, aby sa vyvinuli silné protidoštičkové a antioxidačné činidlá. Pri indukcií agregácie AA, analógy aporfínu (majúce acetylovú skupinu v polohe N<sub>6</sub>, substituent -OCH<sub>3</sub> alebo -OCH<sub>2</sub>Ph v polohe C1 a substituent OCH<sub>3</sub> v polohe C2 v kruhu A) boli najaktívnejšie zlúčeniny v rade a poskytovali vyššiu antiagregačnú aktivitu ako ASA. Antioxidačná aktivita, analógov aporfínu (majúce metylsulfonylový substituent v polohe N<sub>6</sub>, -OCH<sub>3</sub> alebo -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> substituent v C1 a substituent -OCH<sub>3</sub>, -OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub> alebo -OCH<sub>2</sub>Ph na C2 kruhu A) boli najaktívnejšie zlúčeniny zo série <sup>72</sup>.

Ukázalo sa, že substituent na pozícii N6 hral významnú úlohu v protidoštičkovej a antioxidantnej aktivite. Prostredníctvom štruktúrnych modifikácií bolo  $R^1$   $R^2$  možné syntetizovať silné aporfíny vykazujúce obidve aktivity <sup>72</sup>.

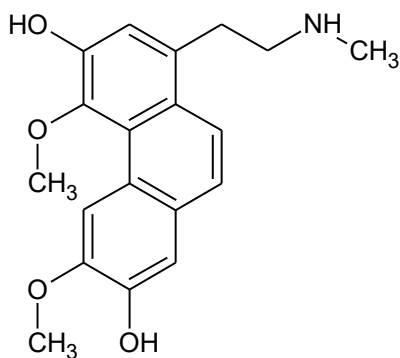
Alkaloidy boldin (1), laurilitin (2), sekoboldin (3), *N*-kyanosekoboldin (4), *N*-metylsekoglaucin (5) a *N*-metylsekopredicentrin (6) sa hodnotili *in vitro* z hľadiska ich schopnosti inhibovať agregáciu krvných doštičiek. Všetky alkaloidy inhibovali agregáciu doštičiek, zároveň inhibovali uvoľňovanie ATP indukované AA a kolagénom v králičích doštičkách. Agregáciu indukovanú PAF, trombínom, syntetický analóg prostaglandínu  $H_2$  (U46619) a ADP bola inhibovaná iba tromi *N*-substituovanými derivátmi sekoboldinu <sup>73</sup>.



laurilitin

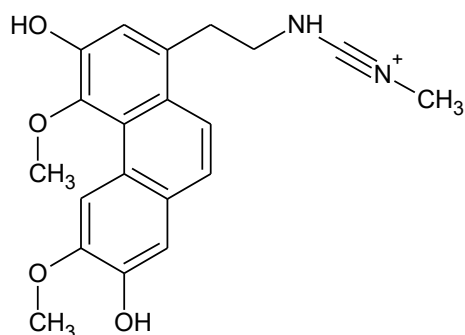


boldin

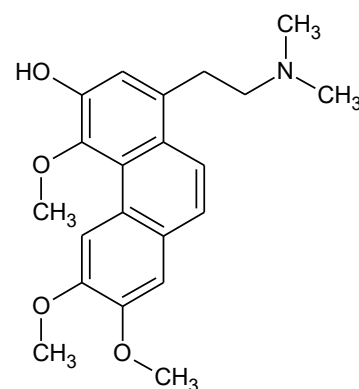


sekoboldin

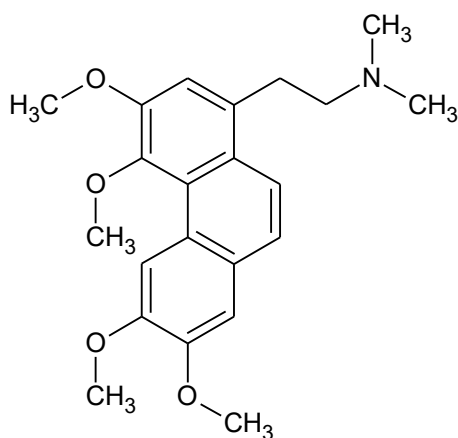
**Obr.12 Štruktúry aporfínových alkaloidov**



*N*-kyanosekoboldin



*N*-metylsekopredicentrin



*N*-metylsekoglaucin

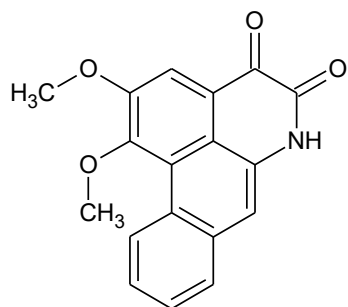
### Obr.12 Štruktúry aporfínových alkaloidov (pokračovanie)

Zlúčenina **5** inhibovala primárnu aj sekundárnu agregáciu. Dospelo sa k záveru, že protidoštičkový účinok týchto alkaloidov je hlavne výsledkom inhibície tvorby  $\text{TxA}_2$ . Zlúčenina **5** má ešte ďalšiu protidoštičkovú aktivitu v dôsledku zvýšenia hladín cyklického adenosínmonofosfátu (cAMP) doštičiek. Protidoštičková účinnosť aporfínových a fenanthrénových alkaloidov sa následne porovnávala pri agregácii krvných doštičiek vyvolanej AA. Zlúčenina **5** bola najsilnejším inhibítorom agregácie indukovanej PAF, minimálna a maximálna účinná koncentrácia bola približne  $30 \mu\text{M}$ , respektíve  $150 \mu\text{M}$ . Neovplyvnila tvorbu inozitolfosfátu zapríčinenú kolagénom, PAF a trombínom, ale zvýšila hladinu cAMP. *N*-Substituované deriváty sekoboldinu by teda mohli mať duálne protidoštičkové účinky a to inhibíciu tvorby  $\text{TxA}_2$  a zvyšovanie hladín cAMP<sup>73</sup>. Je potrebné ďalej skúmať, či zvýšenie tvorby cAMP zlúčeninou **5** je výsledkom priamej aktivácie adenylátcyklázy alebo inhibície

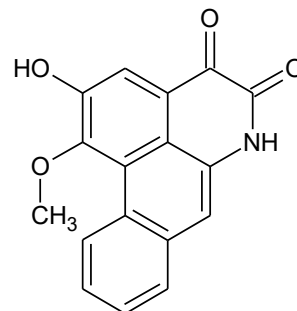
fosfodiesterázy. Pri skúmaní vzťahu štruktúry a aktivity sa zistilo, že aporfínové štruktúry s nižšou polaritou boli účinnejšie. Zlúčenina **2**, ktorá je polárnejšia ako zlúčenina **1**, má menšiu protidoštičkovú aktivitu. Okrem toho fenanthrénové alkaloidy akými je zlúčenina **3**, prispievajú k širšiemu spektru protidoštičkovej aktivity zvýšením hladiny cAMP a zároveň zlúčeniny **4**, **5**, a **6** vykazujú vyššiu účinnosť ako nesubstituovaná zlúčenina **3** <sup>73</sup>.

Uvedieme si aj izoláciu aporfínových alkaloidov z *Aromadendron elegans* C.L.Blume a schopnosť týchto alkaloidov vytesniť väzbu špecifickú pre PAF z krvných doštičiek. Zlúčeniny vykazovali odozvy závislé od dávky, t.j. keď sa koncentrácia zlúčeniny zvýšila, zvýšila sa inhibícia. Spomedzi testovaných zlúčenín sú zlúčeniny: (–)-*N*-acetylnornuciferín (**1**), (–)-*N*-acetylanonín (**2**), ktoré vykazovali silnú inhibíciu agregácie krvných doštičiek spôsobenú všetkými tromi inductormi (AA, kolagén a ADP) s inhibičnými účinkami vyššími ako 60% pri 100 µg/ml. S výnimkou liriodenínu (**3**), ktorý neinhiboval agregáciu krvných doštičiek indukovanú AA, kolagénom alebo ADP, všetky ostatné zlúčeniny vykazovali inhibičné účinky na agregáciu krvných doštičiek. Zlúčenina **2** bola najúčinnjšou protidoštičkovou zlúčeninou ktorá inhibovala AA, kolagén, ako aj ADP-indukovanú agregáciu doštičiek s hodnotami IC<sub>50</sub> = 66,1, 95,2 a 80,6 µM. Pontevedrin (**4**) vykazoval pomerne selektívnu inhibičnú aktivitu agregácie krvných doštičiek indukovanej AA s hodnotou IC<sub>50</sub> = 62,4 µM, zatiaľ čo oxoglucín (**5**) silne inhiboval ADP-indukovanú agregáciu s IC<sub>50</sub> = 100,7 µM, ale nie aktivitu iných inductorov. Na druhej strane predicentrin (**6**) silne inhiboval agregáciu krvných doštičiek indukovanú kolagénom a ADP s hodnotami IC<sub>50</sub> = 63,1 a 114,7 µM. Hodnoty IC<sub>50</sub> všetkých hodnotených zlúčenín boli vyššie ako hodnoty ASA (23,5 µM), účinného inhibítora COX. Okrem zlúčeniny (**5**) vykazovali alkaloidy výraznú inhibíciu agregácie trombocytov indukovanú mnohými inductormi. Protidoštičkový mechanizmus zlúčenín **2** a **4** je pravdepodobne spôsobený inhibíciou tvorby TxA<sub>2</sub>. Štruktúrna aktivita zlúčenín ukázala, že dehydroaporfínový alkaloid (zlúčenina **4**) vykazovala silnú aktivitu proti agregácii indukovanou AA a kolagénom. Substitúcia metoxy skupín na C-1 a C-2 (zlúčenina **1**) metyléndioxy skupinou (zlúčenina **2**) viedla k zvýšeniu aktivity proti agregácii indukovanej AA, kolagénom a ADP. Prítomnosť fenolovej skupiny v kruhu A a metoxy skupín v C-9 a C-10 (zlúčenina **5**) vykazovala výrazný protidoštičkový účinok na agregáciu indukovanou kolagénom a ADP. Oxoaporfínové alkaloidy (zlúčeniny **3** a **5**) neinhibovali agregáciu indukovanú AA <sup>74</sup>.

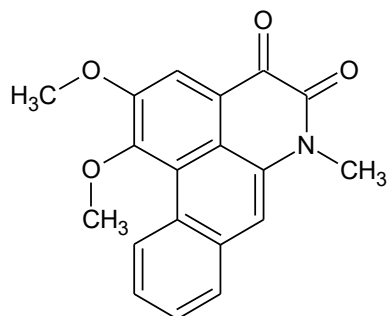
Ďalšou skúmanou rastlinou bola *Houttuynia cordata* Thunb. z čeľade Saururuacea. Je to tradičná liečivá rastlina pestovaná vo východnej Ázii. Táto rastlina má niekoľko farmakologických aktivít vrátane antivírusových, protizápalových a imunostimulačných. Aristolaktámy a dioxoaporfíny sú hlavné štrukturálne typy alkaloidov v tejto rastline. Uvedieme si izoláciu a štrukturálnu identifikáciu deviatich alkaloidov: norcepharadion B (**1**); 4,5-dioxodehydroasimilobin (**2**); cefaradion B (**3**); aristololaktam B II (**4**), aristololaktam A II (**5**), sauristolaktam (**6**), piperolaktam A (**7**), splendidin (**8**), aristololaktam F II (**9**)<sup>75</sup>.



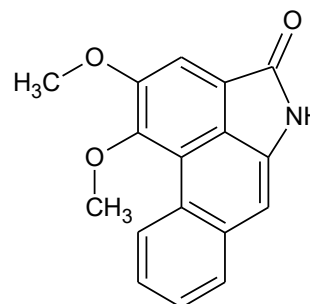
norcepharadion B



4,5-dioxodehydroasimilobin



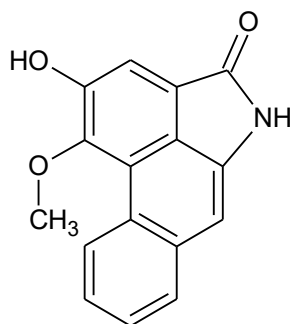
cefaradion B



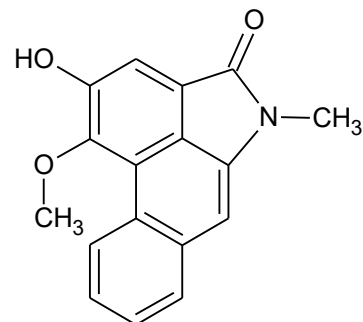
aristololaktam B II

**Obr. 13 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny *Houttuynia cordata***

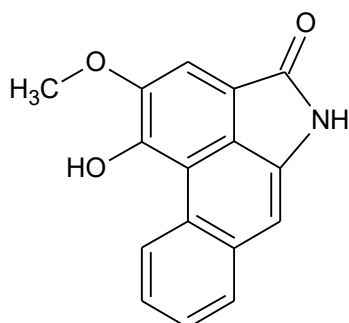




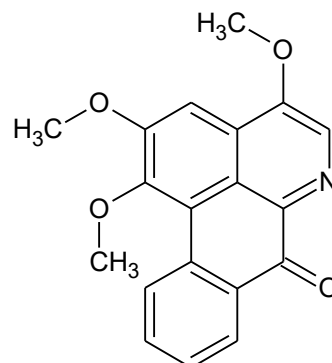
aristololaktam A II



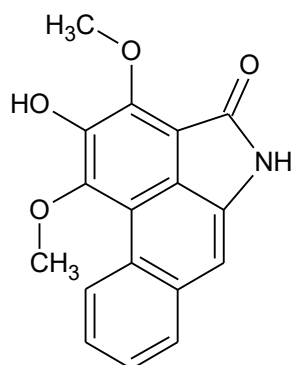
sauristolaktam



piperolaktam A



splendidin



aristololaktam F II

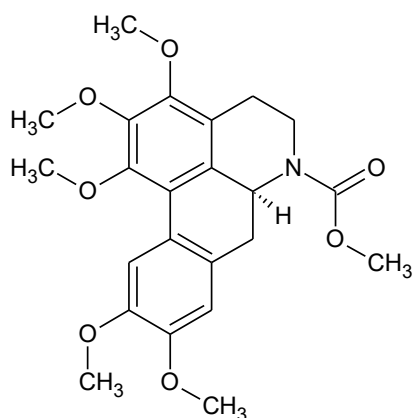
**Obr. 13 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny *Houttuynia cordata* (pokračovanie)**

Spomedzi nich boli zlúčeniny **2**, **6**, **7**, **9** podrobené testu agregácie indukovanou ADP a trombínom. Pri koncentrácii 0,1 mM zlúčeniny **2** a **4** vykazovali silné inhibičné účinky na agregáciu trombocytov indukovanú trombínom a zlúčenina **7** bola silným inhibítorom agregácie trombocytov indukovanou ADP. Zlúčeniny **1**, **2**, **4**, **7** vykazovali významnú inhibíciu agregácie doštičiek indukovanou ADP aj trombínom<sup>75</sup>. Zlúčeniny **5**, **6**, **9** vykazovali významnú

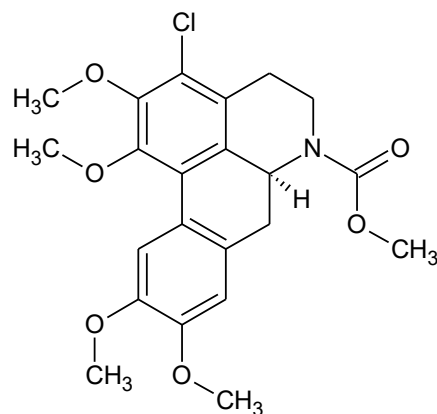
inhibíciu agregácie krvných doštičiek indukovanou len ADP. Z vyššie uvedených výsledkov sa vytvoril vzťah medzi štruktúrou a antiagregačnou aktivitou alkaloidov. Aristolaktámy alebo dioxoaporfíny obsahujúce oboje, teda hydroxylovú skupinu v kruhu A a -NH- skupinu (zlúčeniny **2** a **7**) vykazovali silnú inhibíciu agregácie krvných doštičiek vyvolanej ADP a trombínom. Keď alkaloid neobsahoval žiadnu hydroxylovú skupinu alebo -NH- skupinu (zlúčeniny **3** a **8**), antiagregačná aktivita bola veľmi slabá. Pokiaľ  $R_1$  bol substituovaný hydroxylovou skupinou (ako v zlúčenine **7**), táto skupina bola veľmi dôležitá pre inhibíciu agregácie indukovanej ADP. Substitúcia  $R_2$  v aristolaktámoch zohrávala dôležitú úlohu v antiagregačnej aktivite vyvolanej trombínom. Pokiaľ bol  $R_2$  substituovaný hydroxylovou skupinou (zlúčeniny **5**, **6**, **9**), vykazovali miernu protidoštičkovú aktivitu pokiaľ bola agregácia vyvolaná trombínom. A ak by  $R_2$  bol nahradený metoxylovou skupinou namiesto hydroxylovej skupiny (zlúčenina **4**), zvýšilo by to inhibíciu agregácie krvných doštičiek vyvolanej trombínom <sup>75</sup>.

Inhibičné účinky ďalších piatich aporfínových alkaloidov: *N*-acetylanonin (**1**), *N*-acetylxylopin (**2**), *N*-formylanonin (**3**), liriodenin (**4**) a lanuginozin (**5**) izolovaných z listov *Magnolia obovata* Thunb. z čeľade Magnoliaceae na agregáciu krvných doštičiek sa skúmali a porovnávali s účinkami ASA. Všetky testované zlúčeniny vykazovali na dávke závislé inhibičné aktivity voči ADP, kolagénu, epinefrínu, AA a U46619 (agonista  $PGH_2/TxA_2$  receptora), ktoré sprostredkovali agregáciu krvných doštičiek. Účinky zlúčenín **1**, **2** a **3** boli približne 130-, 190- a 220-násobne silnejšie v inhibícii agregácie krvných doštičiek vyvolaných epinefrínom, 264-, 178- a 244-násobne silnejšie v inhibícii agregácie indukovanej AA a 94-, 92- a 89-násobne vyššie pri inhibícii agregácie indukovanej U46619, ako u ASA. Účinky zlúčenín **1**, **2** a **3** na agregáciu indukovanú ADP alebo kolagénom boli miernejšie ako inhibičné účinky na agregáciu indukovanú epinefrínom, AA alebo U46619, hoci boli silnejšie ako ASA. Oxoaporfíny **4** a **5** vykazovali iba veľmi mierne účinky na všetky testované stimulanty. Tieto výsledky naznačujú, že zlúčeniny **1** a **2** uplatňujú svoje účinky tak, že inhibujú produkciu aj receptorovú väzbu  $TxA_2$ , zatiaľ čo zlúčenina **3** väčšinou inhibuje produkciu  $TxA_2$ . Vykazovali tak 60 – 264 krát silnejšie inhibičné účinky na agregáciu krvných doštičiek indukovanú kolagénom, epinefrínom, AA alebo U46619 ako ASA <sup>76</sup>.

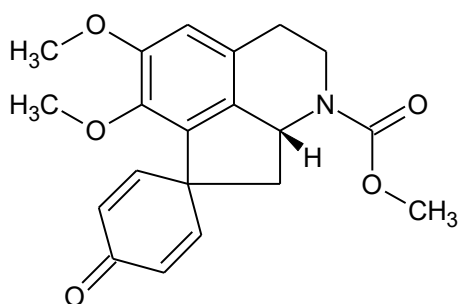
Tri nové alkaloidy, promukozin, romukozin F a romukozin G, boli izolované zo stoniek *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal. *A. purpurea* je hustý strom pochádzajúci zo Strednej a Južnej Ameriky. Jeho ovocie je jedlé a jeho drevo sa používa na výrobu papiera. Rôzne časti stromu sa používajú v tradičnej medicíne. Ovocná šťava je liekom na horúčku, zimnicu, žltáčku a v prípade úplavice či opuchu sa pripravuje odvar z vnútornej kôry. Uvádza sa, že práškové semená sú insekticídne, pričom metylenchloridový extrakt z listov vykazuje silnú toxicitu proti larvám kôrovcov *Artemia salina* a výraznú aktivitu proti larvám komára, *Aedes aegypti*, vektoru žltej zimnice. Aporfinové alkaloidy, ako je romukozin, majú významnú aktivitu protidoštičkovej agregácie. Zdá sa, že tieto aporfínové alkaloidy pôsobia odlišným mechanizmom ako je mechanizmus ASA, o ktorom je známe, že je ireverzibilným inhibítorom oboch foriem COX <sup>77</sup>.



promukozin



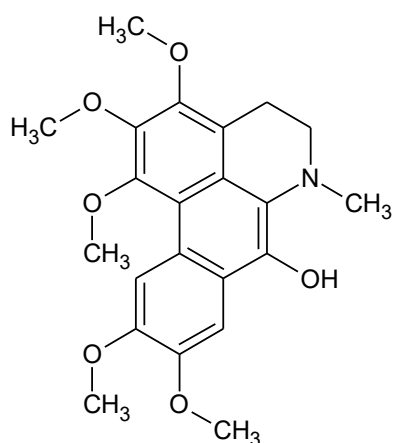
romukozin F



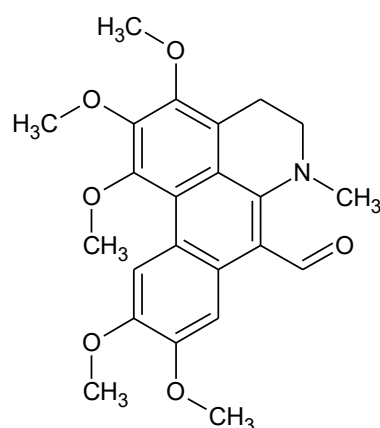
promukozin

**Obr. 14 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny *Annona purpurea***

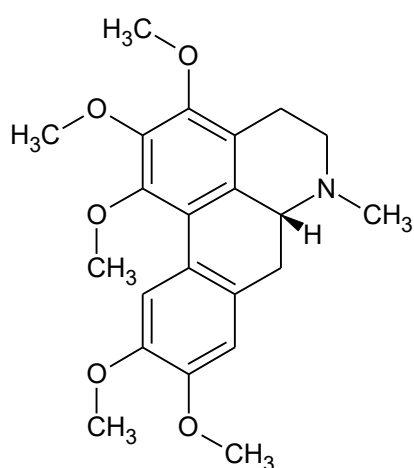
V ďalšej štúdií zameranej na rastlinu *A. purpurea* bolo izolovaných niekoľko aporfínových alkaloidov. V dôsledku pokračujúceho hľadania bioaktívnych látok z prírodných zdrojov sa zistilo, že metanolvý extrakt z listov *A. purpurea* vykazuje významnú antiagregačnú aktivitu proti kolagénovému faktoru *in vitro* z ktorého boli izolované aporfíny: 7-hydroxydehydrotalicsimidin (**1**), 7-formyldehydrotalicsimidin (**2**), taliksimidin (**3**), norpurpurein (**4**). Ďalšie výskumy viedli k izolácii oxopurpureinu (**5**), oxonuciferinu (**6**), oxoglaucinu (**7**), (+)-predicentrinu (**8**), (–)-glaucinu (**9**), a talbaikalidinu (**10**), *N*-formylpurpurein (**11**), thalikipureinu (**12**), dehydrolirinidin (**13**) a 7-hydroxydehydroglaucin (**14**)<sup>78</sup>.



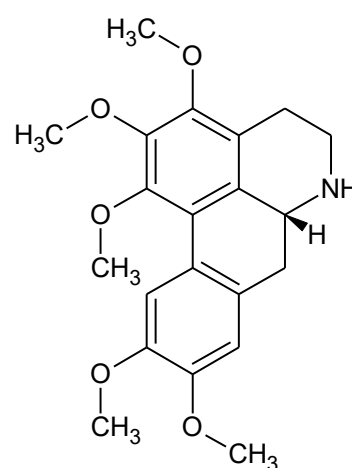
7-hydroxydehydrotaliksimidin



7-formyldehydrotaliksimidin

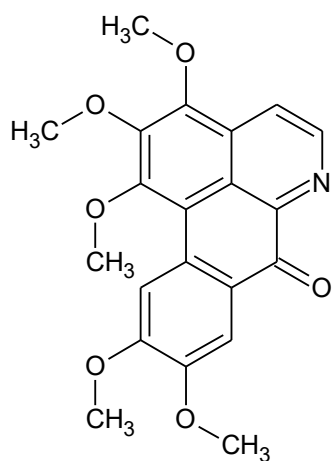


taliksimidin

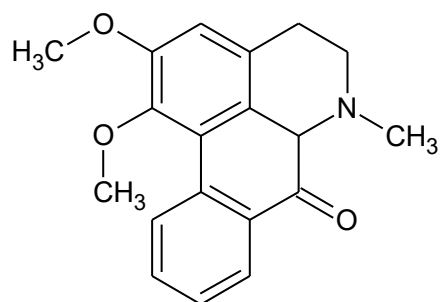


norpurpurein

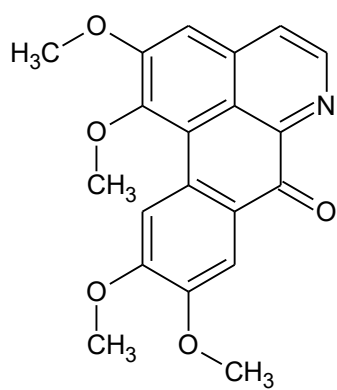
**Obr. 15 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny *Annona purpurea***



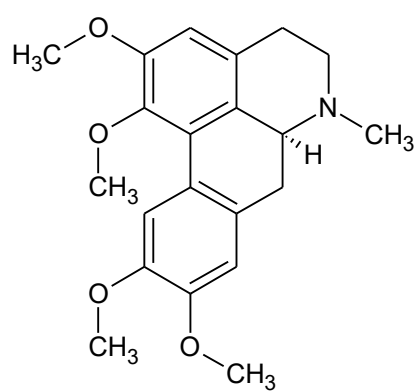
oxopurpurein



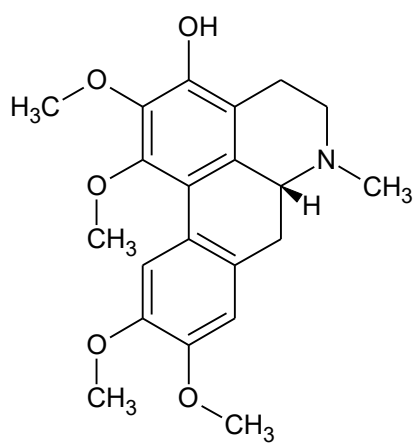
oxonuciferin



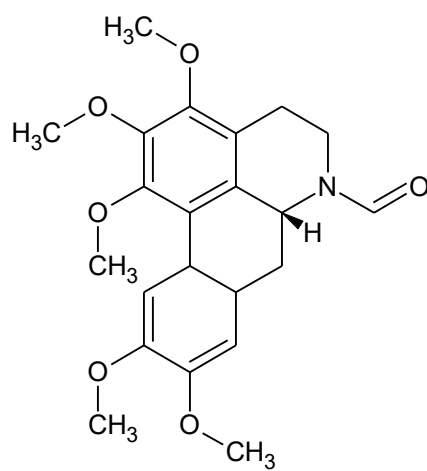
oxoglaucin



(+)-predicentrin

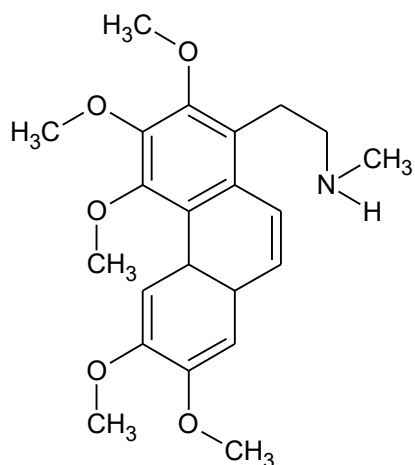


talbaikalidin

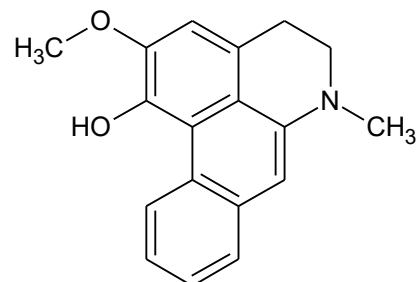


N-formyl-purpurein

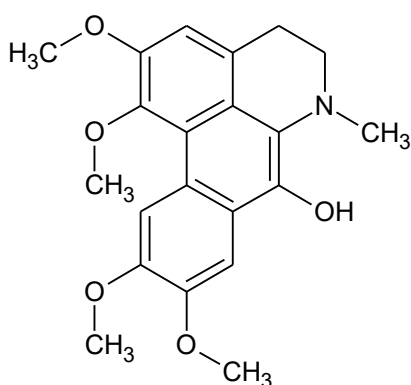
Obr. 15 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny *Annona purpurea* (pokračovanie)



thalipurein



dehydrolirinidin

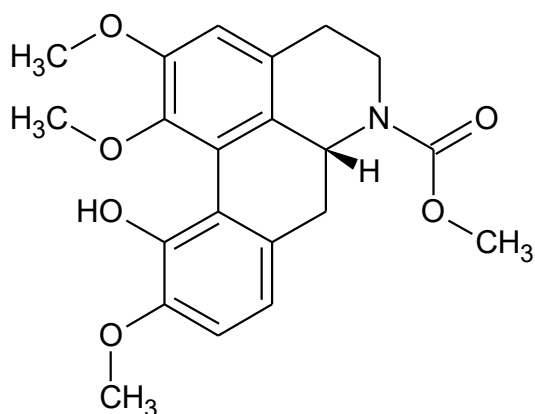


7-hydroxydehydroglauicin

**Obr. 15 Štruktúry aporfínových alkaloidov rastliny *Annona purpurea* (pokračovanie)**

Izolované alkaloidy **1–5**, **11** a **12**, sú členmi špeciálnych pentametoxydom substituovaných zlúčenín. Prítomnosť tejto série zlúčenín a pentaoxygenová zlúčenina **10** viedla k navrhnutiu rozšírenia hypotézy biosyntetickej dráhy parciálnych pentaoxygenovaných aporfínových alkaloidov v *A. purpurea* bola testovaná protidoštičková aktivita spomínaných zlúčenín. Zlúčeniny **5–8**, **10** a **12**, **14** vykazovali inhibíciu agregácie krvných doštičiek vyvolanou kolagénom a AA. Zlúčeniny **12–14** vykazovali inhibíciu agregácie trombocytov indukovanou PAF a zlúčeniny **12** a **14** zároveň vykazovali inhibíciu proti agregácii krvných doštičiek indukovanej trombínom. Dehydroaporfíny, **1** a **14**, vykazovali vysokú selektivitu proti agregácii krvných doštičiek vyvolanej PAF <sup>78</sup>.

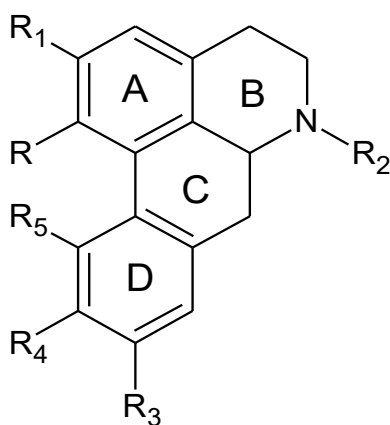
*Annona cherimola* Mill. z čeľade Annonaceae, je subtropický ovocný strom pôvodom z Ekvádoru a Peru, ktorý sa pestuje na južnom Taiwane. Používa sa v ľudovom liečiteľstve na liečenie kožných ochorení, najmä pri vredoch. Pri skúmaní fytochemických a bioaktívnych zlúčenín bol izolovaný alkaloid romukozin H, ktorý sa získal izoláciou zo stoniek *A. cherimola*. Ukázalo sa, že aporfinový alkaloid, ako je romukozin, má významnú antiagregačnú aktivitu v dôsledku inhibície agregácie krvných doštičiek indukovanou AA. Mechanizmus protidoštičkovej agregácie je však odlišný od ASA <sup>79</sup>.



romukozin H

**Obr.16 Štruktúra aporfínového alkaloidu rastliny *Annona cherimola***

V ďalšej štúdií zameranej na rastliny čeľade Annonaceae a Lauraceae sa preukázalo, že (+)-laurotetanin, (–)-diskretamin, aterosperminin, liriodenin a oktein majú výrazné protidoštičkové a vazorelaxačné účinky. V štúdií sa hodnotili protidoštičkové účinky uvedených alkaloidov: (+)-hernovin (**1**), (+)-*N*-metylhernovin (**2**), (+)-*N*-metyl-laurotetanin metyljodid (**3**), (+)-laurolitsin (**4**), (+)-*N*-metyl-10-*O*-metylhernovin (**5**), (+)-nornuciferin (**6**), L-(+)-nandigerin (**7**), (+)-*N*-metylovigerin (**8**), (–)-roemerin (**9**), (+)-*O, O, N*-trimetylhernovin metyljodid (**10**), (+)-*N*-metylhernovin metyljodid (**11**), (+)-magnoflorin (**12**), (+)-*O, N*-dimetylnandigerin metyljodid (**13**), (+)-*O, N*-diacetylaktinodafnin (**14**), dehydrothalicsimidin (**15**), 7-hydroxydehydroglaucin (**16**) a 7-dehydroliridin (**17**) <sup>80</sup>.

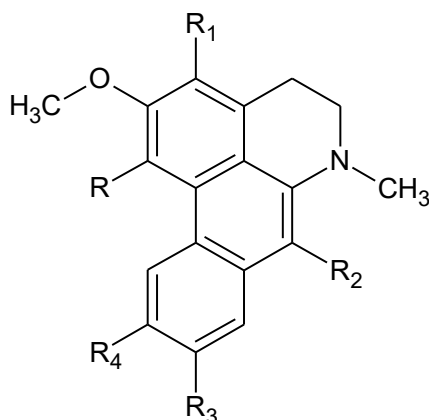


Obr. 17 Štruktúra aporfínových alkaloidov

Tab.7 Zástupcovia aporfínových alkaloidov <sup>80</sup>

Alkaloid	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
L-(+)-hernovin	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>
(+)- <i>N</i> -metylhernovin	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>
(+)- <i>N</i> -metyllaurotetanin metyljodid	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> I <sup>+</sup>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
(+)-laurolitsin	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
(+)- <i>N</i> -metyl-10- <i>O</i> -metylhernovin	OCH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
(+)-nornuciferin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H
-(+)-nandigerin	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>
(+)- <i>N</i> -metylovigerin	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O
(-)-roemerin	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub>	H	H	H
(+)- <i>O,O,N</i> -trimetylhernovin metyljodid	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> I <sup>+</sup>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
(+)- <i>N</i> -metylhernovin metyljodid	OCH <sub>3</sub>	OH	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> I <sup>+</sup>	H	OH	OCH <sub>3</sub>
(+)-magnoflorin	OH	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> I <sup>+</sup>	H	OCH <sub>3</sub>	OH
(+)- <i>O,N</i> -dimetylnandigerin metyljodid	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> I <sup>+</sup>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
(+)- <i>O,N</i> -diacetylaktinodafnin	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H





Obr.18 Štruktúra dehydroaporfínových alkaloidov

Tab.8 Zástupcovia dehydroaporfínových alkaloidov <sup>80</sup>

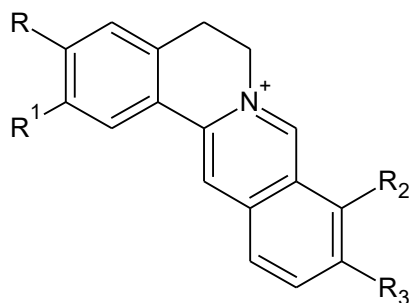
Alkaloid	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
7-hydroxydehydrothalicimidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
7-hydroxydehydroglaučin	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
7-dehydrolirinidin	OH	H	H	H	H

Na indukciu agregácie doštičiek sa použili ADP, AA, kolagén a PAF. Koncentrácie zlúčenín **1** a **15** pri koncentrácii 100 µg/ml silne inhibovali agregáciu krvných doštičiek indukovanú všetkými štyrmi činidlami (ADP, AA, kolagén a PAF). Zo všetkých testovaných zlúčenín iba **1** a **15** významne inhibovali ADP indukovanú agregáciu doštičiek. Zlúčeniny **2**, **6**, **9** a **16** boli silnými inhibítormi agregácie doštičiek indukovanou AA, kolagénom a PAF a **9** tiež vykazovala miernu, ale významnú inhibíciu agregácie indukovanou ADP. Zlúčeniny **4** a **17** vykazovali silné inhibičné účinky na agregáciu indukovanú AA a kolagénom a tiež vykazovali miernu, ale významnú inhibíciu agregácie indukovanú PAF. V tejto štúdii boli zlúčeniny **7** a **8** silnými selektívnymi inhibítormi kolagénom indukovanej agregácie doštičiek. Kvartérne aporfínové alkaloidy **3**, **10**, **11**, **12** a **13** neinhibujú agregáciu krvných doštičiek indukovanú ADP, AA, kolagénom alebo PAF. Tieto výsledky naznačujú, že dehydroaporfínové alkaloidy sú všeobecne významne účinné proti AA a kolagénu. Inhibícia agregácie indukovanej PAF sa zvýšila, ak hydroxylová skupina bola pripojená v polohe C-7 <sup>80</sup>.

Medzi aporfínovými soľami bola zlúčenina **1** mimoriadne inhibičná proti agregácii indukovanej ADP, AA a kolagénom. Boli testované ďalšie dve soli zlúčenín **2** a **11**. Ukázalo sa, že zlúčenina **2** významne inhibuje agregáciu indukovanou AA, kolagénom a PAF ale zlúčenina **11** nemala taký efekt. Takže materské aporfíny a ich soli majú rôzne účinky na inhibíciu agregácie indukovanou ADP, AA, kolagénom a PAF. Zlúčenina **15** bola najúčinnnejšou protidoštičkovou zlúčeninou pretože, inhibovala AA ako aj PAF. Všeobecne boli hodnotené protidoštičkové účinky aporfínových alkaloidov od účinkov ASA, ktorý je inhibítorom COX. Mnoho aporfínov vrátane zlúčeniny **15** vykazovalo významnú inhibíciu viacerých induktorov. Mechanizmus účinku pre **15** a iné aporfíny sa teda môže líšiť od mechanizmu ASA. Je však možné, že zlúčenina **15** môže inhibovať tvorbu  $TxA_2$  v doštičkách <sup>80</sup>.

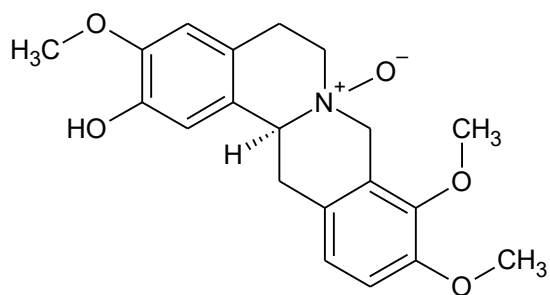
#### 3.5.1.1.2. Protoberberínové alkaloidy

Ďalšou významnou skupinou alkaloidov sú protoberberíny. Tetracyklická kostra je vytvorená z 5-skulerínu postupnou oxidáciou a tvorbou berberínového mostíka. Pre túto štruktúru býva charakteristická metylendioxy skupina, ktorá vzniká po uzatvorení kruhu s následnou O-metyláciou <sup>71</sup>.

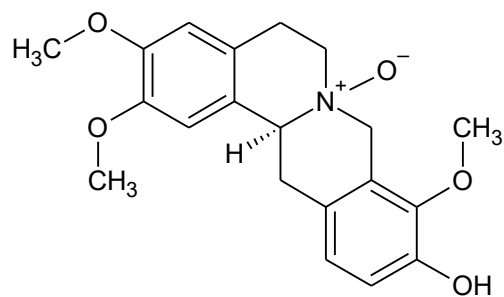


**Obr.19 Základná štruktúra protoberberínových alkaloidov**

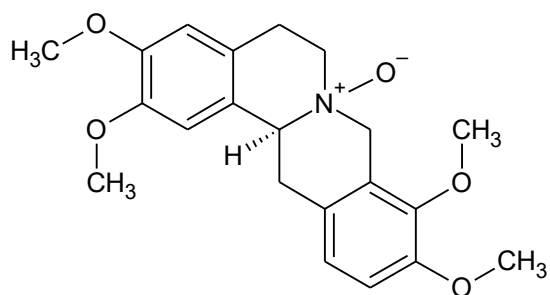
*Corydalis tashiroi* Makino (Papaveraceae) je dvojročná bylina distribuovaná v južnom Japonsku, Číne a na Taiwane. Rastliny tejto rodiny sú bohaté na isochinolínové alkaloidy s hlavnými zložkami tetrahydroprotoberberinu, berberinu a protopinu. Extrakty z rastlín majú významnú aktivitu proti agregácii krvných doštičiek a aj *in vitro* cytotoxickú aktivitu. Zistilo sa, že alkaloidy uvedenej rastliny (–)-*cis*-isokorypalmin *N*-oxid (**1**), (–)-*cis*-korydalmin-*N*-oxid (**2**), epikorynoxidin (**3**), (–)-*trans*-korydalmin-*N*-oxid (**4**), korynoxidin (**5**), (–)-*trans*-isokorypalmin-*N*-oxid (**6**), skulerin (**7**) a korydalmin (**9**) majú aktivitu proti agregácii doštičiek <sup>81</sup>.



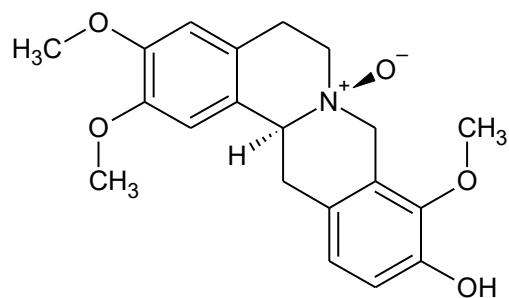
(-)-*cis*-isokorypalmin-*N*-oxid



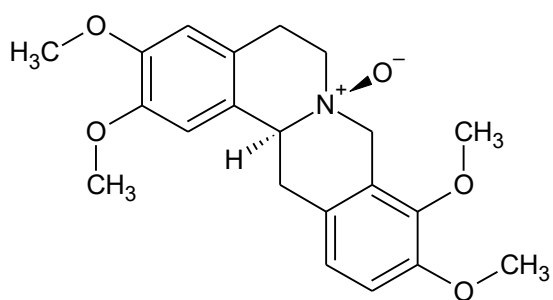
(-)-*cis*-korydalmin-*N*-oxid



epikorynoxidin

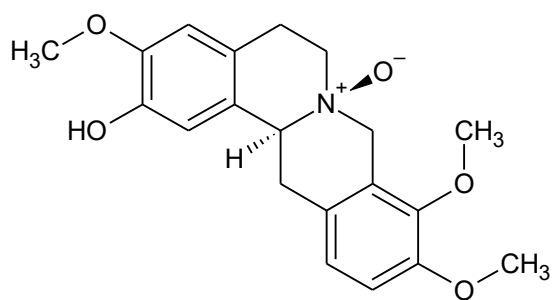


(-)-*trans*-korydalmin-*N*-oxid

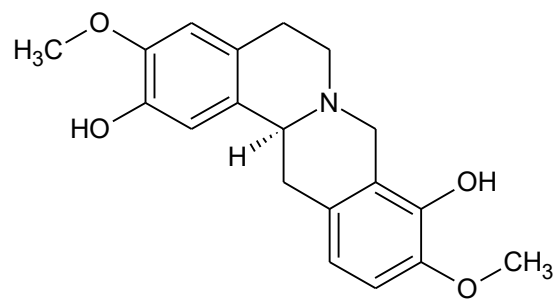


korynoxidin

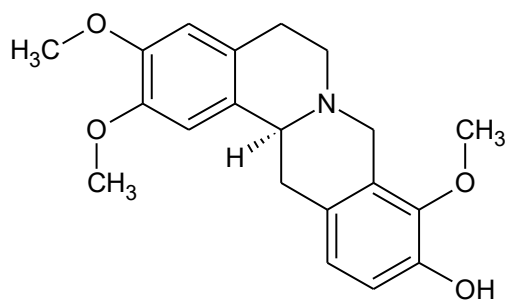
**Obr.20 Štruktúry protoberberínových alkaloidov rastliny *Corydalis tashiroi***



(-)-*trans*-isokorypalmin-*N*-oxid



skulerin



korydalmin

**Obr.20 Štruktúry protoberberínových alkaloidov rastliny *Corydalis tashiroi* (pokračovanie)**

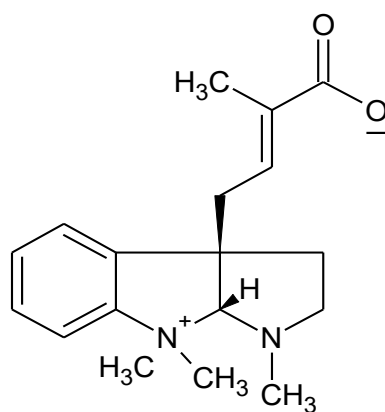
Zlúčeniny **1**, **2**, **4** a **6** vykazovali takmer úplnú inhibíciu agregácie trombocytov indukovanou AA a kolagénom pri 100 µg/ml. Zlúčeniny **3** a **7** vykazovali výraznú inhibíciu agregácie trombocytov indukovanou kolagénom pri 100 µg/ml. Po druhé, zlúčeniny **2** a **4** vykazovali silnejšiu inhibičnú aktivitu ako zlúčenina **9** na agregáciu trombocytov indukovanou AA a kolagénom v dôsledku účinku *N*-oxidových skupín. Spomedzi tetrahydroprotoberberínových *N*-oxidových alkaloidov **1,2,3,4,5** a **6** mali fenolové alkaloidy **1,2,4** a **6** silnejšiu inhibičnú aktivitu ako nefenolové na agregáciu krvných doštičiek indukovanou AA a kolagénom <sup>81</sup>.

### 3.5.2. Alkaloidy odvodené od tryptofánu

#### 3.5.2.1. Indolové alkaloidy

##### 3.5.2.1.1. Pyrolidinoindolínové alkaloidy

Nedávno sa zistilo, že signalizácia PI3K/Akt je cenným cieľom antitrombotickej liečby bez výrazného účinku na primárnu hemostázu. Čeláď Selaginellaceae Willk. zahŕňa jediný rod *Selaginella* Beauv. *Selaginella* je rod s takmer celosvetovou distribúciou. Zahŕňa približne 700 druhov z toho 72 druhov z Číny, z ktorých sa viac ako 20 druhov používa v tradičnej čínskej medicíne. Na podporu krvného obehu sa používa niekoľko druhov *Selaginella*, vrátane *S. delicatula* Alston, *S. moellendorffii* Hieron, *S. nipponica* Franch & Sav, *S. sanguinolenta* (L.) Spring, *S. stauntoniana* Spring a *S. tamariscina* (P Beauv). Nebolo však opísané, že zlúčeniny odvodené od týchto druhov majú terapeutické účinky na kardiovaskulárne choroby. Izolovalo a identifikovalo sa osem pyrolidinoindolínových alkaloidov z rastliny *Selaginella moellendorffii* Hieron. Po skríningu na agregáciu doštičiek sa zistilo, že jedna zlúčenina, Psm2, vykazuje silnú protidoštičkovú aktivitu<sup>82</sup>.



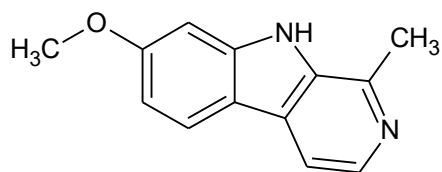
Psm2

Obr.21 Štruktúra pyrolidinoindolínového alkaloidu

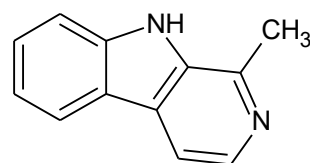
V štúdii sa zistilo, že pyrrolidinoindolínový alkaloid Psm2 z *S. moellendorffii* inhiboval agregáciu ľudských krvných doštičiek indukovanú rôznymi agonistami. Psm2 inhiboval agregáciu trombocytov indukovanou ADP, trombínom, U46619 a kolagénom a blokoval adhéziu trombocytov k imobilizovanému fibrinogénu a kolagénu bez ovplyvnenia väzby receptora GPIIb/IIIa k fibrinogénu. Podobne ako inhibítor PI3K $\beta$ , salvianolová kyselina A (SAA), Psm2 vykazoval silnejšiu inhibičnú aktivitu na agregáciu doštičiek indukovanou ADP, kolagénom a U46619 ako na agregáciu doštičiek indukovanou trombínom. Pri zvyšujúcich sa koncentráciách agonistov, s výnimkou ADP, sa inhibícia agregácie krvných doštičiek výrazne znížila, čo naznačuje, že kolagénom a U46619 indukovaná agregácia doštičiek do značnej miery závisí od sekrécie ADP. Tieto výsledky naznačujú, že Psm2 funguje ako inhibítor PI3K v krvných doštičkách a tým bráni aktivácii receptora GPIIb/IIIa, čo vedie k inhibícii agregácie krvných doštičiek. Dráha PI3K, dráha p38MAPK a Src tyrozínkináza sú tri dôležité signálne dráhy doštičiek, ktoré významne prispievajú k aktivácii receptorov GPIIb/IIIa. V súlade s výsledkami agregácie krvných doštičiek Psm2 inhiboval fosforyláciu Akt<sup>Ser473</sup> indukovanú kolagénom, ADP a U46619 účinnejšie, ako fosforyláciu Akt<sup>Ser473</sup> indukovanú trombínom. Inhibičné účinky na fosforyláciu Akt<sup>Ser473</sup> sa znížili, keď sa zvýšila koncentrácia agonistov s výnimkou ADP. Všetky tieto výsledky naznačujú, že Psm2 môže blokovať signalizáciu PI3K a tým inhibovať agregáciu krvných doštičiek. V krvných doštičkách sú exprimované rôzne izoformy PI3K vrátane PI3K $\beta$ . Ukázalo sa, že PI3K $\beta$  hrá významnú úlohu pri regulácii aktivácie a adhézie receptora GPIIb/IIIa, čo je potrebné pre šírenie doštičiek a trvalú agregáciu doštičiek najmä, ak sú odozvy doštičiek vyvolané pomocou ADP. Ukázalo sa, že Psm2 môže interagovať s PI3K $\beta$  vytváraním vodíkových väzieb so zvyškami lyzínu-776 a lyzínu-799 jeho aktívneho miesta, čo naznačuje, že Psm2 ovplyvňuje signalizáciu PI3K /Akt v krvných doštičkách prostredníctvom inhibície PI3K $\beta$ . Výsledky jasne ukazujú, že Psm2 má antitrombotický účinok a vyššiu účinnosť ako ASA, tradičné protidoštičkové činidlo a môže byť kandidátom na antitrombotické činidlo. Riziko krvácania pri podaní Psm2 bol nižší ako u ASA. Tieto výsledky ukázali, že Psm2 je bezpečná a účinná zlúčenina na antitrombotickú terapiu <sup>82</sup>.

### 3.5.2.1.2. $\beta$ -Karbolinové alkaloidy

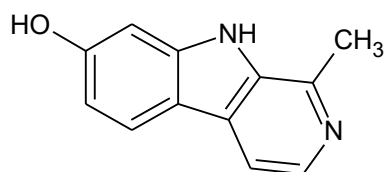
$\beta$ -Karbolinové alkaloidy vrátane harmalolu (**1**), harmalinu, (**2**) norharmanu (**3**), harmolu (**4**), harminu (**5**) a harmanu (**6**) sú dôležitými zložkami liečivej rastliny *Perganum harmala* L. (Zygophyllaceae), ktorá sa používa v tradičnej medicíne. Skúmala sa protidoštičková aktivita šiestich  $\beta$ -karbolinových alkaloidných zlúčenín. Pri koncentrácii 200  $\mu$ M nemajú tieto zlúčeniny žiadny účinok na agregáciu trombocytov stimulovanú AA, trombínom a U46619. Naopak sa zistilo, že kolagénom indukovaná agregácia trombocytov môže byť týmito zlúčeninami inhibovaná s rôznymi potenciami: zlúčeniny **6** a **5** boli najúčinnnejšie, zlúčenina **4** mala strednú potenciu a zlúčeniny **3**, **1** a **2** mali slabý, nesignifikantný účinok. Celkovo tieto výsledky ukazujú, že tri z týchto šiestich  $\beta$ -karbolinových alkaloidov môžu selektívne ovplyvňovať agregáciu krvných doštičiek indukovanú kolagénom a ich protidoštičkové aktivity môžu byť sprostredkované inhibíciou fosforylácie PLCG2 a proteínovej tyrozínovej fosforylácie s postupným potlačením mobilizácie cytosolického vápnika a uvoľňovania AA <sup>83</sup>.



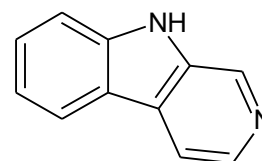
harmin



harman

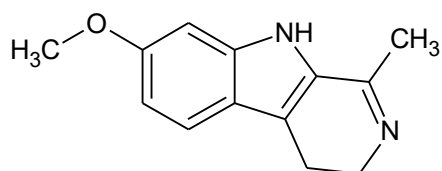


harmol

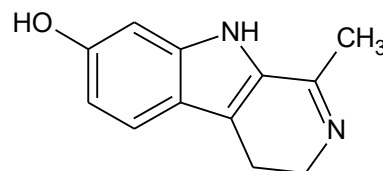


norharman

Obr.22 Štruktúra  $\beta$ -karbolinových alkaloidov



harmalin



harmalol

## Obr.22 Štruktúra $\beta$ -karbolínových alkaloidov (pokračovanie)

Z hľadiska vzťahu štruktúry a inhibície agregácie krvných doštičiek sa zdá, že dvojité väzby v polohe C4-C9 tricyklickej aromatickej štruktúry poskytujú bazálnu inhibíciu agregácie krvných doštičiek vyvolanej kolagénom, pretože zlúčeniny **1** a **2** vykazovali najslabšiu protidoštičkovú aktivitu, ktorej chýba dvojité väzby. Zavedenie metylovej skupiny v polohe C13 by mohlo zosilniť inhibíciu, pretože zlúčenina **3** bola omnoho slabšia ako zlúčenina **6**. Okrem toho sa antiagregačná účinnosť menila s charakterom skupín zmenených v polohe C1. Aktivácia kolagénového receptora (GPVI) vedie k fosforylácii mnohých proteínových tyrozínových zvyškov, po ktorej nasleduje aktivácia PLCG2 v krvných doštičkách. Aktivácia PLCG2 zvyšuje mobilizáciu cytosolického vápnika a aktivuje proteínkinázu C, čo vedie k zmene tvaru krvných doštičiek, pričom sekrécia granúl a adhézia závisia od uvoľňovania ADP a  $\text{TxA}_2$ /PGH<sub>2</sub>. Dokázalo sa, že tieto zlúčeniny potláčajú fosforyláciu PLCG2 indukovanú kolagénom, rovnakým spôsobom ako pri agregácii. Ďalšia analýza odhalila, že zlúčeniny **5** a **6** môžu v závislosti od koncentrácie inhibovať fosforyláciu PLCG2 a sekvenčnú cytoplazmatickú mobilizáciu  $\text{Ca}^{2+}$ . Presný mechanizmus účinku  $\beta$ -karbolínových alkaloidov na kolagén zostáva neznámy. V prípade agregácie krvných doštičiek sprostredkovanej trombínom hrá aktivácia PLC ústrednú úlohu a U73122, dobre známy inhibítor PLC, môže inhibovať agregáciu krvných doštičiek indukovanou kolagénom aj trombínom. Kolagénom indukovaná liberácia AA bola tiež inhibovaná zlúčeninami **5** a **6** spôsobom závislým od koncentrácie. Okrem toho môže byť vazorelaxačný účinok zlúčeniny **6** zahrnutý v hypotenzívnom účinku, pričom k vazorelaxácii dochádza prostredníctvom uvoľňovania oxidu dusnatého, sprostredkovaného EB a aktivácie napätovo závislých  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov <sup>83</sup>.

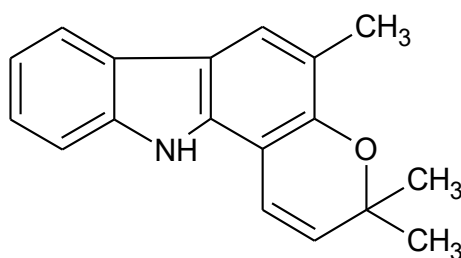
Alkaloid harman (**6**) ako  $\beta$ -karbolín je antidepresívum, antiagregancium, antidiabetikum. Zároveň je aj inhibítorom aj AChE a myeloperoxidázy. Vykazuje antioxidačné, antiparazitické a hypotenzívne účinky <sup>84</sup>. Zmierňuje syndróm abstinencie od morfénu a má aj



antinociceptívne účinky. Tento alkaloid sa vyskytuje aj v niekoľkých potravinách s vysokou koncentráciou najmä v mäse. Existuje niekoľko dôkazov, že harmanu podobné  $\beta$ -karbolíny interagujú s viacerými receptormi, ako sú napríklad serotonínové, dopamínové, benzodiazepínové, opiátové, nikotínové, histamínové a imidazolínové a tak sprostredkujú početné farmakologické účinky. Na rozdiel od bežných neurotransmitterov by sa mohol považovať za jedinečný endogénny ligand s odlišným transportným systémom. Alkaloid **1**, inhiboval kolagénom sprostredkovanú PLCG2 a proteínovú tyrozínovú fosforyláciu. Študovaný bol taktiež jeho tlmivý efekt na AChE. V štúdii z roku 2013 vedci pozorovali selektívnu inhibíciu ACh alkaloidom **1** a tak má úzky terapeutický vzťah k AD. Alkaloid **1** inhibuje aj myeloperoxidázu čo je enzým, ktorý má význam v rôznych patologických stavoch, ako sú ateroskleróza, zápal a imunita. Ako prírodný chemický mediátor vykazuje tremorogénne účinky a môže ovplyvňovať učenie a pamäť. Pri Parkinsonovej chorobe je uvedená koncentrácia tohto alkaloidu o 50 % viac ako bežná endogénna produkcia. Zistilo sa, že táto zlúčenina je vysoko neurotoxická a je považovaná ako biomarker Parkinsonovej choroby <sup>84</sup>.

### 3.5.2.1.3. Karbazolové alkaloidy

Ukázalo sa, že *Murraya euchrestifolia* Hayata (Rutaceae) je bohatým zdrojom karbazolových alkaloidov napríklad girinimbinu (**1**), ktorý vykazuje antiagregačný účinok. Alkaloid **1** je reverzibilný inhibítor agregácie krvných doštičiek a uvoľňovania ATP, indukovaný rôznymi induktormi <sup>85</sup>.

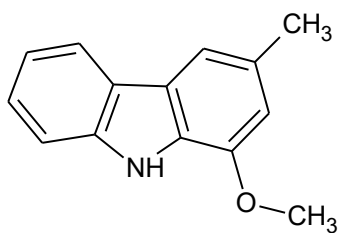


girinimbin

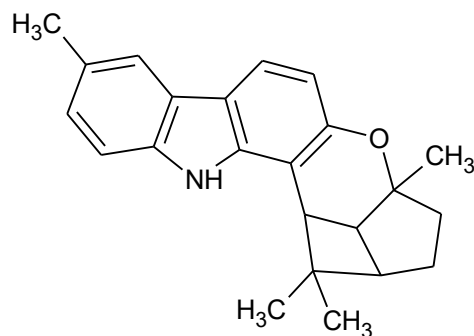
**Obr.23 Štruktúra karbazolového alkaloidu**

Medzi jeho mechanizmy účinku patrí priama inhibícia aktivity COX doštičiek a zvýšenie hladiny cAMP. Inhiboval tvorbu TxA<sub>2</sub> indukovaného AA, kolagénom, PAF a trombínom. Inhiboval tiež AA indukovaný rozpad fosfoinozítidu a vzostup intracelulárneho Ca<sup>2+</sup> bez ovplyvnenia tých, ktoré boli indukované U46619, PAF a trombínom. V plazme bohatej na krvné doštičky inhiboval iba sekundárnu agregáciu. Podobne ako indometacín, alkaloid **1** inhiboval tvorbu PGD<sub>2</sub> v prítomnosti AA. Vysoké koncentrácie alkaloidu **1** (40 a 80 µM) kompletné inhibovali agregáciu trombocytov indukovanú kolagénom, ale U46619 a PAF len čiastočne. V experimentálnych údajoch zvýšil alkaloid **1** (20 a 80 µM) obsah cAMP doštičiek, ktorý sa môže podieľať na inhibícii kolagénom indukovaných doštičiek. Mechanizmus inhibície agregácie indukovanej U46619 a PAF alkaloidom **1** nie je v súčasnosti známy. Je potrebné ďalej skúmať, či zvýšenie tvorby cAMP pomocou spomínaného alkaloidu je spôsobené priamou aktiváciou adenylátcyklázy alebo inhibíciou fosfodiesterázy <sup>85</sup>.

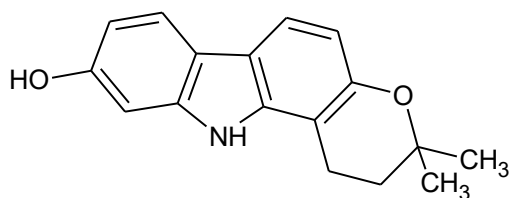
Rastliny rodu *Murraya* J. Koenig ex L., z čelade Rutaceae prirodzene rastúce v južnej Ázii, sú kríky vysoké 4 až 5 m. Výťažky z listov a kôry sa používajú ako ľudový liek na analgéziu, lokálnu anestéziu a na liečbu ekzému, reumatizmu, bolesti brucha, žalúdka, bolesti zubov, hnačky, edémov, trombózy zároveň aj ako expektorancia, antikonvulzívne, anodynové a detoxikačné činidlá. Zistilo sa, že listy a korene *M. euchrestifolia* vykazujú výraznú aktivitu proti agregácii krvných doštičiek a majú slabý vazorelaxačný účinok. Z koreňovej kôry *M. euchrestifolia* sa získalo jedenásť karbazolových alkaloidov: murrayafolin-A (**1**), 3-metylkarbazol, murrayanin, kyselina mukoeová, murrayazolidin, (+)-murrayazolin, girinimbin (**2**), mahanimbin, murrafolin-A, murrafolin-B a bismurrayafolin-A. 14 karbazolových alkaloidov: bicyklomahanimbin, murrayamin-M (**3**), alkaloid **2**, murrayaminu-A (**4**), mahaniminu, (+)-mahanin(**5**), murrayaminu-D, -E, -F, -I, -J, -K, -N, izomahanin a triterpenoid friedelin sa získalo z listov tej istej rastliny <sup>86</sup>.



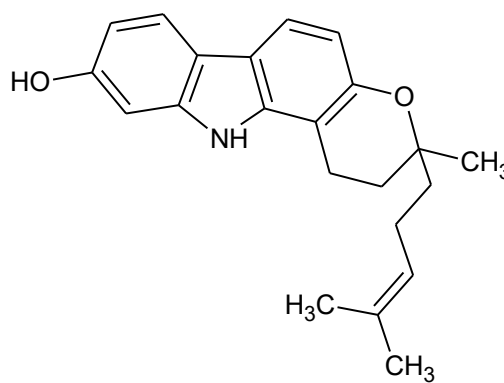
murrayamin-M



murrayafolin-A



murrayamin-A



(+)-mahanin

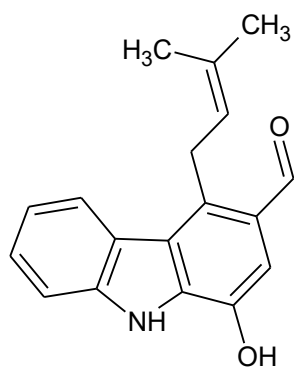
#### Obr.24 Štruktúry karbazolových alkaloidov rastliny *Murraya euchrestifolia*

Väčšina izolovaných karbazolových alkaloidov vykazovala silnú inhibičnú aktivitu na agregáciu doštičiek králikov indukovanú AA (100  $\mu$ M), kolagénom (10  $\mu$ g/ml) a PAF (2 ng/ml). Zlúčeniny (3) a (4) pri koncentrácii 2  $\mu$ g/ml, vykazovali najsilnejšiu antiagregačnú aktivitu indukovanú PAF a kolagénom. Zlúčeniny (1), (3) a (5) vykazovali dvojitý účinok v závislosti na dávke. Pri vysokých dávkach podporovali agregáciu, ale pri nízkej koncentrácii vykazovali antiagregačné účinky <sup>86</sup>.

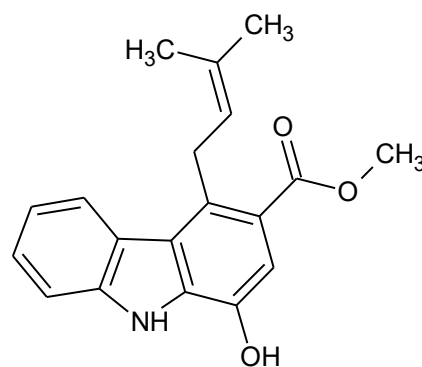
Účinky girinimbínu sa pozrovali aj v inej štúdii. Tento pyranokarbazol bol prvýkrát izolovaný z kmeňovej kôry *Murraya koenigii* (L.) Spreng.(Rutaceae). Našiel sa aj v koreňoch *Clausena heptaphylla* (Roxb.) Wight & Arn. a v koreňovej kôre *M. euchrestifolia*. Alkaloid poskytuje široké spektrum farmakologických účinkov ako sú protinádorové, protizápalové, protirakovinové, protidoštičkové a antioxidačné <sup>87</sup>. Uviedlo sa tiež, že alkaloid 1 spolu s inými

karbazolmi, mahanimbinom a murrayacinom vykazujú silnú aktivitu proti komárovi *Aedes aegypti*. Vedci syntetizovali nové deriváty alkaloidu **1** alkyláciou a acyláciou *N*-konca prirodzene izolovaného alkaloidu **1** od *M. koenigii*, pretože upútal svojimi farmakologickými aktivitami. Päť nových derivátov alkaloidu **1** bolo úspešne semi-syntetizovaných modifikáciou na *N*-konci prirodzene izolovaného alkaloidu **1**. *N*-benzylgirinimbin, *N*-butylgirinimbin a *N*-izopentylgirinimbin sa získali alkylačnou reakciou, zatiaľ čo *N*-butyrylgirinimbin a *N*-metylbutyrylgirinimbin sa získali acylačnou reakciou <sup>87</sup>.

*Clausena excavata* Burm.f. (Rutaceae) sa používa ako ľudový liek na liečbu hadieho uštipnutia, bolesti brucha a ako detoxikačný prostriedok. V štúdií sa izolovalo 5 karbazolových alkaloidov, klausinov B, E, H, I a K a skúmala sa ich protidoštičková a vazorelaxačná aktivita. Zlúčeniny vykazovali silnú inhibičnú aktivitu na agregáciu doštičiek králikov indukovanú AA (100  $\mu$ M), kolagénom (10  $\mu$ g/ml) a PAF (2 ng/ml). <sup>88</sup> Taktiež sa tento účinok potvrdil v inej štúdii, v ktorej sa izolovali dva karbazolové alkaloidy: klausin-D (**1**) a klausin-F (**2**), ktoré boli izolované z kmeňovej kôry *C. excavata* zozbieranej na Taiwane. Agregácia trombocytov indukovaná AA ukázala 53 % a 37 % inhibíciu zlúčeninami **1** a **2** pri koncentrácii 1  $\mu$ g/ml, v danom poradí. V prípade kolagénu ako induktora agregácie krvných doštičiek vykazovali zlúčeniny **1** a **2** pri 10  $\mu$ g/ml 66 % a 48 % inhibíciu <sup>89</sup>.



klausin-D

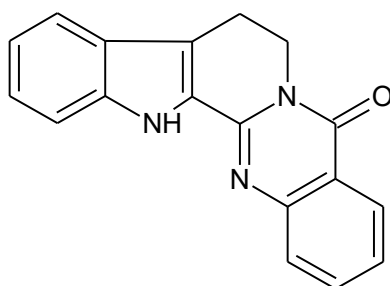


klausin-F

**Obr.25 Štruktúry karbazolových alkaloidov rastliny *Clausena excavata***

#### 3.5.2.1.4. Indolochinazolínové alkaloidy

*Evodia rutaecarpa* C.C. Huang (Rutaceae) je známa tradičná čínska rastlina a v čínskej lekárskej praxi sa už dlho používa. Sušené nezrelé plody *E. rutaecarpa* sa používa ako liek na gastrointestinálne poruchy, bolesti hlavy, amenoreu a popôrodné krvácania. Z *E. rutaecarpa* bolo izolovaných niekoľko biologicky aktívnych zložiek vrátane rhetsininu (1), wuchuyinu (2), rutaevinu (3), dehydroevodiaminu (4), evodiaminu (5) a rutekarpinu (6). Zlúčenina 4 má hypotenzívne, bradykardické, vazodilatačné a antiarytmické účinky. Zlúčenina 5, ktorá sa redukuje na dehydroevodiamin, môže mať pozitívny inotropný účinok na izolovanú ľavú predsieň morčiat, antianoxický, vazodilatačný a kardiovaskulárny účinok<sup>90</sup>.



rutekarpin

#### Obr.26 Štruktúra indolochinazolínového alkaloidu

Zlúčenina 6 inhibovala agregáciu trombocytov stimulovanú rôznymi agonistami ako kolagén, ADP, adrenalin a AA. Zlúčenina 6 v koncentrácii 40–200  $\mu\text{M}$  významne neovplyvnila hladiny cAMP a cGMP v doštičke, zatiaľ čo významne inhibovala tvorbu  $\text{TxA}_2$  stimulovaného kolagénom (10  $\mu\text{g/ml}$ ) a trombínom (0,1 U/ml). Inhiboval tvorbu inozitolmonofosfátu (IP) stimulovaného kolagénom a trombínom v doštičkách. Triflavin je protištičkový peptid obsahujúci glycín a kyselinu asparagovú, ktorý je purifikovaný z hadieho jedu *Trimeresurus flavoviridis*. Inhibuje väzbu fibrinogénu na aktivované krvné doštičky, čo naznačuje, že triflavin inhibuje agregáciu krvných doštičiek priamym zasahovaním do väzby fibrinogénu na receptory fibrinogénu spojeného s komplexom GP IIb/IIIa. V súčasnosti je známe, že väzba fibrinogénu na komplex GP IIb/IIIa sa javí ako konečná spoločná cesta agregácie krvných doštičiek vyvolanej agonistom<sup>90</sup>. Zlúčenina 6 (40–200  $\mu\text{M}$ ) v závislosti od dávky inhibovala agregáciu

ľudských doštičiek indukovanou kolagénom, ADP a adrenalinom inhibíciou tvorby  $\text{TxA}_2$  a rozkladom fosfoinozítidu. Uvádza sa, že sa objavuje vazorelaxujúci účinok zlúčeniny **6**. Mechanizmus môže byť závislý od endotelu a zahrnúť NO a guanylátcyklázu. Triflaviny sa viažu na komplex GP IIb/IIIa na pokojovej a aktivovanej doštičke, čo vedie k interferencii s fibrinogénom a jeho špecifickým receptorom. Alkaloid **6** nevykazoval významný vplyv na triflavin viažuci sa na komplex GP IIb/IIIa z čoho vyplýva, že protidoštičková aktivita nie je priamo spôsobená interferenciou s väzbou fibrinogénu na komplex GP IIb/IIIa na povrchu membrány doštičiek. Otázkou bolo zistiť, či sa oxid dusnatý podieľal na inhibícii agonistom indukovanej agregácie trombocytov alkaloidom **6**. Uvádza sa, že krvné doštičky obsahujú L-arginín/NO dráhu a NO syntetázovú aktivitu v cytosolovej frakcii, ktorá môže byť spojená s agregáciou krvných doštičiek. Alkaloid **6** v koncentrácii (100 a 200  $\mu\text{M}$ ) významne neovplyvnil hladinu produkcie dusičnanov (10  $\mu\text{g/ml}$ ) pri indukcii agregácie kolagénom. Výsledky naznačujú, že NO pochádzajúci z doštičiek a zmenená tekutosť membrány nehrajú významnú úlohu v protidoštičkovej aktivite tohto alkaloidu. Zlúčenina **6** v koncentrácii (40–200  $\mu\text{M}$ ) významne inhibovala tvorbu  $\text{TxA}_2$  krvných doštičiek stimulovaných trombínom (0,1 U/ml) alebo kolagénom (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Rutakarpin neovplyvnil aktivitu tromboxan syntetázy v mikrozómoch trombocytov ošetrovaných ASA, čo naznačuje že táto inhibícia tvorby  $\text{TxA}_2$  zlúčeninou **6**, aspoň čiastočne nie je spôsobená inhibíciou tromboxan syntetázy v doštičkách. Zlúčenina **6** však významne inhibovala uvoľňovanie AA v doštičkách aktivovaných kolagénom. Štúdia okrem toho naznačuje, že rutakarpin (100 a 200  $\mu\text{M}$ ) nemal významný vplyv na aktivitu COX v ľudských doštičkách <sup>90</sup>.

Tieto výsledky naznačujú, že zlúčenina **6** inhibovala tvorbu  $\text{TxA}_2$  v aktivovaných doštičkách, prostredníctvom iných intracelulárnych sekundárnych dráh, než priamo aktivitu PLA2 na membráne doštičiek. Zlúčenina **6** v závislosti od dávky inhiboval zvýšenie  $\text{Ca}^{2+}$  iónov ako aj štiepenie fosfoinozítidu stimulovaného kolagénom (10  $\mu\text{g/ml}$ ) v myoinozitole krvných doštičiek. Existuje silný dôkaz, že inozitol-1,4,5-trifosfát indukuje uvoľňovanie  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárnych zásob. Preto sa zdá, že zlúčenina **6** ovplyvňuje mobilizáciu  $\text{Ca}^{2+}$ , pravdepodobne v dôsledku inhibície rozkladu fosfoinozítidov. V skutočnosti sa preukázalo, že rozklad fosfoinozítidov môže indukovať tvorbu  $\text{TxA}_2$  uvoľňovaním AA diglyceridovou lipázou alebo endogénnou PLA2 z membránových fosfolipidov <sup>90</sup>. Môže teda dôjsť k inhibícii rozkladu

fosfoinozítidu po ktorom nasleduje inhibícia tvorby  $\text{TxA}_2$  a následne inhibícia  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizácie pri agregácii krvných doštičiek stimulovanou agonistami. Na druhej strane rôzne koncentrácie zlúčeniny **6** (50, 100 a 200  $\mu\text{M}$ ) inhibovali tvorbu inozitolmonofosfátu v závislosti od dávky stimulovaného kolagénu (10  $\mu\text{g/ml}$ ) v doštičkách naplnených myoinozitolom. Dospelo sa k záveru, že protidoštičková aktivita zlúčeniny **6** môže byť pravdepodobne spôsobená výskytom aktivity fosfolipázy C<sup>90</sup>.

Rutekarpin je pentacyklický indolopyridochinazolinový alkaloid nachádzajúci sa v *E. rutaecarpa* a iných príbuzných bylinách, ktorý má množstvo zaujímavých biologických vlastností. Vedci sa zamerali na syntézu, biologickú aktivitu a vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou s ohľadom na jednotlivé deriváty rutakarpinu (**1**). Tento alkaloid má kardiovaskulárne účinky, protidoštičkové, antitrombotické, protirakovinové, protizápalové, analgetické účinky, vazodilatačné, cytotoxické a cholinesterázové inhibičné účinky. Zároveň má účinky na endokrinný systém, termoregulačné účinky a účinky na hladké svaly. Okrem toho sa uvádza aj aktivita proti ateroskleróze. Protidoštičková aktivita rutekarpínu bola spôsobená inhibíciou tvorby  $\text{TxA}_2$  a rozkladu fosfoinozítidov. Alkaloidy 2,3-methylendioxyrutekarpin, 3-chlororutekarpin a 3-hydroxyrutekarpin skúmané v tejto štúdii, vykazovali 100% inhibíciu voči agregácii indukovanej AA pri 5  $\mu\text{g/ml}$ . Avšak agregácia indukovaná ADP (0,22  $\mu\text{M}$ ), trombínom (0,1 U/ml), kolagénom (10  $\mu\text{M}$ ) a PAF (2  $\mu\text{g/ml}$ ) neboli alkaloidom **1** ovplyvnené. Taktiež bola preukázaná silná inhibičná aktivita (64% inhibícia pri 100  $\mu\text{g/ml}$ ) z rastliny *Evodia officinalis* Dode proti AChE a jej silná antiamnestická aktivita viedla k zisteniu, že dehydroevodiamin bol pôvodcom týchto biologických aktivít. Bolo pripravených mnoho derivátov alkaloidu **1** a derivátov 7,8-dehydrorutekarpinu (**2**), z toho mnoho derivátov alkaloidu **1** vykazovalo silnú inhibičnú aktivitu proti AChE a BChE so selektivitou ku AChE. Ďalšie štruktúrne modifikácie alkaloidu **2** viedli k dramatickému zvýšeniu aktivity a selektivity voči AChE<sup>91</sup>.

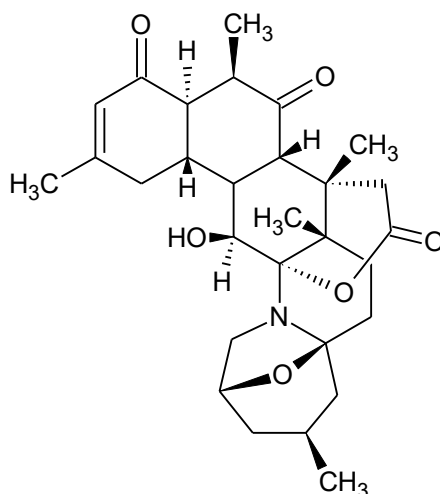
Tri indolopyridochinazolinové alkaloidy: 1-hydroxyrutekarpin (**1**), rutekarpin (**2**), a 1-metoxyrutekarpin (**3**) sú aktívne zložky s antiagregačnými účinkami na krvné doštičky izolované z plodov *Zanthoxylum integrifolium* Merr. (Rutaceae). Inhibičná aktivita zlúčenín **1-3** na agregáciu indukovanou AA bola silnejšia v porovnaní s kolagénom<sup>92</sup>. Spomedzi troch indolopyridochinazolinových alkaloidov, najsilnejšiu protidoštičkovú aktivitu proti AA

vykazovala zlúčenina **1** s hodnotou  $IC_{50}$  1–2  $\mu\text{g/ml}$ , v porovnaní s 5–10  $\mu\text{g/ml}$  v prípade zlúčenín **2** a **3**. ASA sa použila ako referenčná kontrola. Mechanizmus antiagregačného účinku týchto alkaloidov sa môže líšiť od mechanizmu ASA, pretože bola zároveň inhibovaná kolagénom indukovaná agregácia doštičiek <sup>92</sup>.

### 3.5.2.2. Chinolínové alkaloidy

Zástupcovia rodu *Zoanthus* patriace medzi korálovce sú schopné biosyntetizovať skupinu dusíkatých morských metabolitov známych ako zoanthaminové alkaloidy. V posledných niekoľkých rokoch bolo hlásených viac ako 12 týchto alkaloidov. Napríklad zoanthamin (**1**), zoanthenamid (**2**), zoanthamid (**3**), 28-deoxyzoanthenamid (**4**) inhibovali zápalové procesy inhibíciou forbol myristát acetátu (PMA). Norzoanthamin (**5**), ktorý je inhibítorom IL-6 sa vyvíja ako sľubné osteoporotické liečivo. Norzoanthaminon (**6**), epinorzoanthamin (**7**) a oxyzoanthamin (**8**) inhibovali rast línie leukemicných buniek P-388. Alkaloidy zoanthaminového typu boli izolované a identifikované zo surových extraktov korálovcov: *Zoanthus nymphaeus* Lam. a neidentifikovaný druh *Zoanthus sp*, ktorý bol zozbieraný v prílivovej zóne v Punta Hidalgo, Bajamar na Tenerife na Kanárskych ostrovoch (Španielsko). *Z. nymphaeus* sa vyskytuje na pobreží Salvador de Bahia (Brazília) a obsahuje alkaloidy ako zoanthamin **1**, 3-hydroxynorzoantamín (**9**) a zoanthaminon (**10**). Okrem spomínaných sa izolovali 11-hydroxyzoanthamin (**11**), 11-hydroxynorzoanthamin (**12**), 30-hydroxynorzoanthamin (**13**), epioxyzoanthamin (**14**), zoanthenol (**15**) a syntetický derivát norzoanthamin (**16**) sa získal metyláciou zlúčeniny (**5**) s  $\text{CH}_2\text{N}_2$ . Skúmala sa protidoštičková aktivita alkaloidov a ASA na agregáciu indukovanú trombínom (0,075 UI/ml), kolagénom (12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) alebo AA (15  $\mu\text{M}$ ). Ako referenčná kontrola sa použila ASA v koncentrácii 0,25 mM <sup>93</sup>.





11-hydroxyzoanthamin

### Obr.27 Štruktúra chinolínového alkaloidu

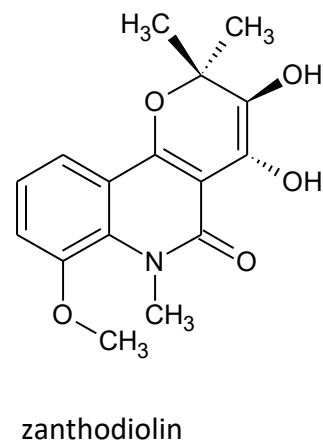
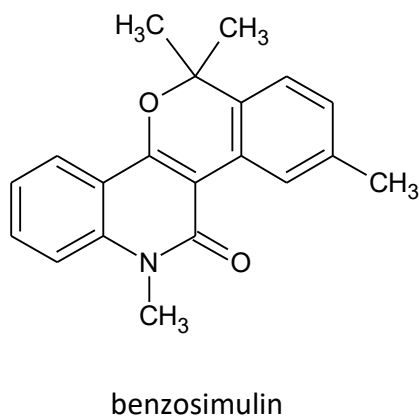
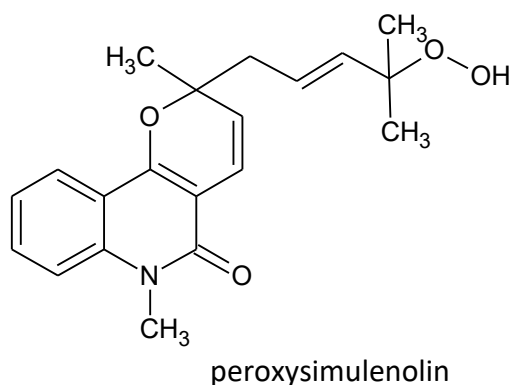
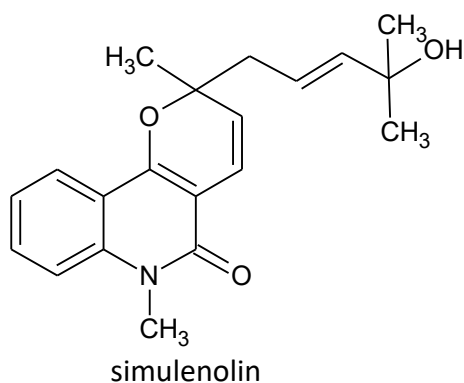
Skupina piatich alkaloidov **9**, **12**, **13**, **11** a syntetický derivát **16**, vykazovali jasnú inhibičnú aktivitu na agregáciu indukovanú všetkými tromi použitými stimulačnými činidlami. Medzi týmito zlúčeninami však boli výrazné rozdiely v aktivite. Na jednej strane zlúčeniny **11** (0,3; 0,5 a 1 mM) a **16** (0,3; 0,5 a 1 mM) silne inhibovali agregáciu krvných doštičiek indukovanú trombínom, kolagénom a AA. Tieto zlúčeniny takmer úplne inhibovali agregáčne reakcie pri najvyšších použitých koncentráciách. Na druhej strane zlúčeniny **9** (0,125; 0,5 a 1 mM), **12** (0,3 a 1 mM) a **13** (0,3 a 1 mM) vykazovali selektívnejší účinok na agregáciu indukovanú kolagénom a AA. Pri koncentrácii 1 mM zlúčenina **12** úplne inhibovala agregáciu indukovanú kolagénom a AA, zatiaľ čo zlúčenina **9** spôsobila viac ako 80% inhibíciu agregácie indukovanej oboma činidlami. Naopak agregácia indukovaná trombínom bola znížená zlúčeninou **12** na 52 % a zlúčeninou **9** na 24 %, obe pri koncentrácii 1 mM. Aj keď zlúčenina **13** vykazovala rovnaký profil, správala sa ako menej účinné protidoštičkové činidlo. Nevyhnutné kroky v aktivácii doštičiek môžu zahŕňať stimuláciu vstupu vápnika do bunky, aktiváciu PKC alebo zníženie hladín intracelulárneho cAMP.  $\text{TxA}_2$  je dôležitý v procese agregácie, najmä keď je agregácia trombocytov vyvolaná AA (priamym metabolizmom na  $\text{TxA}_2$ ) alebo kolagénom (prostredníctvom aktivácie fosfolipázy A2). Preto by inhibícia syntézy  $\text{TxA}_2$  alebo blokovanie jeho receptorov mohli byť zapojené do antiagregačných účinkov tejto skupiny zoanthaminov, najmä v prípade zlúčenín **9**, **12** a **13** <sup>93</sup>.

Ďalšia séria zoanthamínov boli selektívne inhibítory kolagénom indukovanej agregácie krvných doštičiek. To je prípad zlúčenín **15** (72% inhibícia pri 0,5 mM), **8** (50% inhibícia pri 0,5 mM) a **14** (14% inhibícia pri 0,5 mM). Tieto zlúčeniny by mohli špecificky interferovať s podstatným krokom pri aktivácii doštičiek indukovanej kolagénom a prostredníctvom antagonizmu jeho receptora. Zlúčenina **8** pri zvýšenej koncentrácii 1 mM a zlúčenina **10** pri koncentráciách v rozmedzí 0,125–1,51,5 mM vykazovali intenzívny, ireverzibilný proagregačný účinok. Vo všetkých prípadoch proagregačná aktivita prekročila 50 % odozvy vyvolanej trombínom pri 0,075 UI/ml, jedného z najsilnejších agonistov krvných doštičiek <sup>93</sup>.

Zo vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou vyplýva, že prítomnosť ďalšej hydroxylovej skupiny na C-11 sa inaktívna zlúčenina **1** premení na najaktívnejšiu zlúčeninu **11**. Táto zlúčenina vykazuje úplnú inhibíciu agregácie krvných doštičiek indukovanú kolagénom, AA a trombínom. Ďalej je podobný účinok pozorovaný u zlúčeniny **5**, čo je inaktívna zlúčenina z hľadiska agregácie trombocytov, ktorá sa stáva aktívnou a selektívnou s prítomnosťou ďalšej hydroxylovej skupiny na C-3 v prípade zlúčeniny **9**, C-30 zlúčeniny **13** alebo na C-11 zlúčeniny **12**. V poslednom prípade v alkaloid **12** je inhibícia pri najvyššej koncentrácii úplná proti agregácii indukovanej kolagénom a AA. Keď je na uhlíku C-26 hydroxylová skupina ako v zlúčenine **8** alebo **14**, vytvorí sa vo vzťahu k zlúčenine **1** antiagregačná aktivita. Neprítomnosť metylovej skupiny C-26 viedla v niektorých prípadoch k zvýšeniu selektívneho inhibičného účinku voči kolagénu a AA zlúčeninami **12**, **9**, **13** v porovnaní so zlúčeninou **11**. Ďalší stupeň nenasýtenosti medzi C-10/C-11, ktorý je prítomný v aktívnom semisyntetickom deriváte **16**, robí z inaktívneho norzoantaminu **5** jeden z najaktívnejšieho derivátu tejto série. Stupeň oxidácie okolo kruhov A a B na kostre zoanthaminu môže modulovať účinok na krvné doštičky. V prípade zlúčeniny **8** sa teda pozoruje selektívny inhibičný účinok proti agregácii indukovanej kolagénom. Podobná a silná selektívna aktivita sa pozorovala zo zlúčeninou **15**, ktorá vykazuje aromatizáciu kruhu A. Na rozdiel od vyššie uvedených inhibičných účinkov, zlúčeniny **8** a **10** spôsobili ireverzibilnú agregáciu krvných doštičiek. Prítomnosť hydroxylovej skupiny na uhlíkoch C-11 a C-26 v týchto zlúčeninách vo vzťahu k zoanthaminu posilňujú pozíciu pre biologickú aktivitu <sup>93</sup>. Výsledky naznačujú, že zavedenie jednej oxidovanej funkcie v kombinácii s prítomnosťou alebo neprítomnosťou metylovej skupiny C-26 v tejto triede alkaloidov sú dva zo základných faktorov súvisiacich s moduláciou inhibičnej agregácie trombocytov, pretože

najaktívnejšie zoanthaminové typy alkaloidov majú v tejto polohe hydroxylovú skupinu: zlúčeniny **11** a **16** sú účinné látky proti agregácii indukovanej všetkými tromi stimulačnými činidlami, zlúčenina **12** má efekt proti agregácii indukovanej kolagénom a AA <sup>93</sup>.

Z kôry *Zanthoxylum simulans* Hance, čo je pichľavý ker distribuovaný v Číne a na Taiwane z čelade Rutaceae, boli izolované spolu s 22 známymi zlúčeninami tri nové pyranochinolínové alkaloidy: simulenolin (**1**), peroxysimulenolin (**2**) a benzosimulin (**3**) zanthodiolin (**4**). Okrem pyranochinolínových alkaloidov boli izolované aj furochinolínové alkaloidy– skimmianin (**13**),  $\gamma$ -fagarin (**14**) a robustin (**15**); chinolónové alkaloidy– zanthosimulin (**5**), zanthobugeanin (**6**), huajiaosimulin (**16**), zanthobisquinolon (**17**) a edulitin (**18**) <sup>94</sup>.

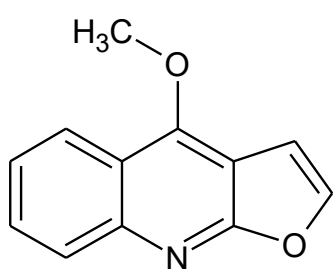


**Obr.28 Štruktúry chinolínových alkaloidov rastliny *Zanthoxylum simulans***

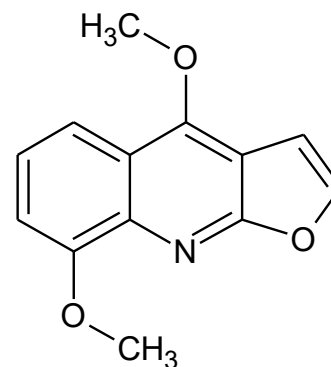
Frakcia kmeňovej kôry *Z. simulans* vykazovala silnú protidoštičkovú aktivitu *in vitro*. Frakcionácia vedená biologickým testom viedla k izolácii alkaloidov **1**, **3**, **6**, **13**, **14**, **15**, **16**, **18**, **19** ako účinných látok s antiagregačnou aktivitou proti doštičkám <sup>94</sup>.

Všetky izolované pyranochinolíny s výnimkou zlúčeniny **5** v koncentrácii 100 µg/ml vykazovali úplnú alebo takmer úplnú inhibičnú aktivitu na agregáciu krvných doštičiek indukovanú AA, kolagénom a PAF. Agregácia vyvolaná trombínom sa však zvlášť inhibovala v prítomnosti zlúčeniny **16** v koncentrácii 100 µg/ml. V porovnaní so 4-metoxy-1-metyl-2-chinolónom sa zdá, že selektívna inhibícia agregácie krvných doštičiek indukovaná AA a strata selektívnej aktivity pyranochinolínov súvisí s prítomnosťou pyranového kruhu <sup>94</sup>.

*Z. simulans* sa používa ako ľudový liek na liečbu hadieho uštipnutia a žalúdočnej nevoľnosti na Taiwane. V štúdii sa pri izolácii alkaloidov extrahovali aj chelerythrin (**1**), diktamnín (**2**), bokonolín (**3**), dihydrochelerythrin (**4**), *N*-acetylasimilobín (**5**), haplopin (**6**) a γ-fagarín (**7**) z koreňového dreva tejto rastliny. Furochinolínové alkaloidy, vykazovali významnú inhibíciu agregácie krvných doštičiek pri 100 µg/ml indukovanou AA a kolagénom. Najmä alkaloidy **2**, **6**, **7** vykazovali úplnú inhibičnú aktivitu na agregáciu trombocytov indukovanú AA. Inhibovali tiež značne kolagénom indukovanú agregáciu krvných doštičiek <sup>95</sup>.

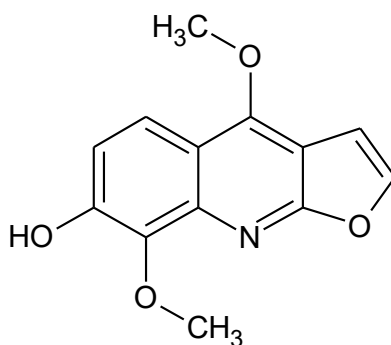


diktamnín



γ-fagarín

**Obr.29 Štruktúry chinolínových alkaloidov *Zanthoxylum simulans***



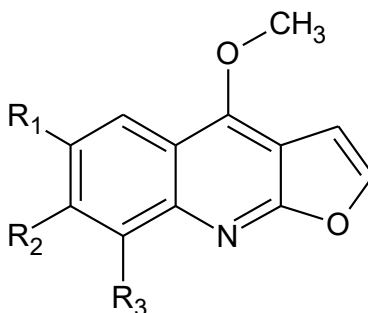
haplopin

**Obr.29 Štruktúry chinolínových alkaloidov *Zanthoxylum simulans* (pokračovanie)**

*Melicope semecarpifolia* (Merr.) T. G. Hartley a *Melicope confusa* (Merr.) P. S. Liu sú malé až stredne veľké, vždyzelené trojlísté stromy, ktorý sa distribuuje na Taiwane a na Filipínach. Listy týchto rastlín sú bohaté na furochinolínové alkaloidy a niektorým z nich vrátane aj troch nových chinolínových alkaloidov z listov *M. semecarpifolia* boli dokázané antiagregačné vlastnosti. Testovali sa antiagregačné vlastnosti chinolínových alkaloidov: konfusadin (**1**), vrátane šiestich furochinolínových alkaloidov: skimmianin (**2**), konfusamelin (**3**), kokusaginin (**4**), haplopin (**5**), dutadrupin, (–)-7,8-dimethoxyplatydesmin a dvoch 2-chinolónových alkaloidov: edulinin, glykocitridin. Ako induktory agregácie sa použil: trombín (0,1 U/ml), AA (100  $\mu$ M), kolagén (10  $\mu$ g/ml) a PAF (2 ng/ml). Hlavné izoláty **2**, **3**, **4** a **5** mali výrazné účinky na agregáciu krvných doštičiek. Spomedzi nových minoritne extrahovaných alkaloidov, iba alkaloid **1** pri koncentrácii 50 a 100  $\mu$ g/ml vykazoval výraznú inhibíciu agregácie trombocytov indukovanú AA, kolagénom a PAF a všetky ostatné zlúčeniny nevykazovali zrejmu aktivitu. To by mohlo podporiť teóriu, že protidoštičková aktivita *M. semecarpifolia* bola spôsobená hlavnými izolátmi <sup>96</sup>.

Zo štúdie, pri ktorých testovali hlavné furochinolínové alkaloidy (konfusamelin (**1**), skimmianin (**2**), kokusaginin, a *O*-metylkonfusamelin (**3**) a ich soli: skimmianin pikrát (**4**), kokusaginin pikrát (**5**), *O*-metylkonfusamelin pikrát (**6**)) z listov *M. confusa* dospeli k nasledovným výsledkom. Vykazovali významnú inhibičnú aktivitu proti agregácii vyvolanej niekoľkými agregáčnymi činidlami ako ADP (20  $\mu$ M), AA (100  $\mu$ M), kolagénom (10  $\mu$ g/ml) alebo PAF (3,6 nM). Pri koncentrácii 100  $\mu$ g/ml zlúčeniny **1**, **3**, **4** a **6** kompletne a zlúčeniny **2** a **5** čiastočne inhibovali agregáciu trombocytov indukovanú AA a kolagénom <sup>97</sup>.

Všetky tieto zlúčeniny len slabo inhibovali agregáciu krvných doštičiek spôsobenú ADP alebo PAF. Ich inhibičné aktivity na AA a kolagénom indukovanú agregáciu doštičiek sú paralelné: zlúčeniny **3** a **6** majú najväčší antiagregačný účinok. ASA sa použil ako referenčná kontrola a ako antiagregačné liečivo pri AA indukovanej agregácii je v porovnaní so skúmanými alkaloidmi 60-krát menej účinné. Hoci je protidoštičkový efekt týchto zlúčením podobný ASA, nie je zatiaľ známe či je to mechanizmom inhibície COX <sup>97</sup>.



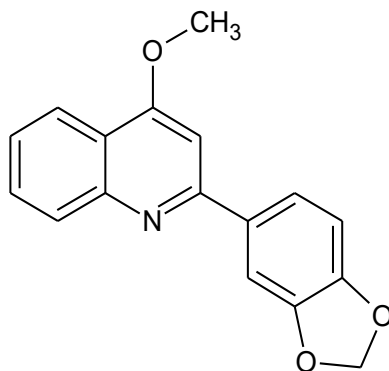
**Obr.30 Základná štruktúra furochinolínových alkaloidov**

Z vyššie uvedených záverov je možné vyvodiť nasledujúce závery: voľná forma furochinolínového typu alkaloidov a ich soli sa nijako významne nelíšia pokiaľ ide o inhibíciu agregácie indukovanou ADP, AA, kolagénom a PAF. Skúmané alkaloidy vykázali signifikantné účinky na inhibíciu agregácie doštičiek indukovanou AA a kolagénom, no žiaľ nepriniesli signifikantný výsledok pre agregáciu doštičiek indukovanú ADP a PAF <sup>97</sup>.

Taktiež sa izolovali aj chinolínové alkaloidy z koreňovej kôry *M. semecarpifolia*: 2-acetylevolitrin (**1**), 2-acetylptelein (**2**) a semekarpifolin (**3**), spolu s 26 zlúčeninami. Alkaloidy (–)-7,8-dimetoxyplatydesmin (**4**), *cis*-(+)-7,8-dimetoxymyrtopsin (**5**) a (3*R*)-(–)-8,9-dimetoxygeibalsin (**6**) boli izolované ako nové prírodné produkty. Keďže metanolvý extrakt z koreňovej kôry *M. semecarpifolia* vykazuje silnú aktivitu proti agregácii krvných doštičiek, táto skutočnosť sa použila ako základ pre súčasnú štúdiu na identifikáciu látok zodpovedných za tento účinok. V králičích trombocytoch trombín (0,1 U/ml), AA (100 µM), kolagén (100 µg/ml) a PAF (2 ng/ml) spôsobili agregáciu doštičiek. Frakcionácia viedla k izolácii zlúčenín: konfusamelin (**7**), kokusaginin (**8**), osthénol (**9**), osthol (**10**), ayanin (**12**), evolitrin (**13**), diktamnín (**14**), skimmianín (**15**), haplopin (**16**), platydesmin (**17**) ako účinné látky s antiagregačnou aktivitou. Všetky furochinolínové alkaloidy **7**, **8**, **13**, **14**, **15** a **16** vykazovali inhibičnú aktivitu na agregáciu krvných doštičiek pri 100 µg/ml indukovanú AA a kolagénom <sup>98</sup>.

Zlúčenina **8** pri koncentrácii 50 µg/ml vykazovala selektívnu inhibičnú aktivitu agregácie krvných doštičiek indukovanú AA. Dihydrofurochinolínová zlúčenina **17**, bez substituenta v kruhu A, vykazovala selektívnu inhibičnú aktivitu agregácie krvných doštičiek pri 100 µg/ml indukovanú kolagénom <sup>98</sup>.

Rastlina *Ruta graveolens*, L., z čeľade Rutaceae, je pôvodom z Európy a je pestovaná v Severnej Číne a na Taiwane. Používa sa v ľudovom liečiteľstve ako antipyretikum, diuretikum a antitoxikum. Bolo hlásené, že *R. graveolens* má spasmolytickú aktivitu voči izolovanému ileu králikov, blokuje gangliá u potkanov a mačiek. Má protinádorové, protiplesňové a antifertilné aktivity. Z koreňov a vzdušných častí *R. graveolens* sa izolovalo devätnásť zlúčenín. Bola skúmaná ich protidoštičková a cytotoxická aktivita. Spomedzi nich diktamin (**1**), skimmianin (**2**) ďalej psoralen, chalepentin, klausindin a graveolinin vykazovali významnú inhibíciu agregácie trombocytov vyvolanú AA a kolagénom. Arborinin, alkaloid **1**, isopimpinellin a graveolin (**3**) vykazovali cytotoxickú aktivitu proti nádorovým bunkovým línii KB, HeLa, DLD, NCI a Hepa. Metanolvý extrakt alkaloidov z koreňa *R. graveolens* vykazoval 65,4% a 81,1% inhibíciu agregácie krvných doštičiek indukovanú AA (100 µM) a kolagénom (10 µg/ml). Metanolvý extrakt vzdušných častí *R. graveolens* vykazoval inhibičnú aktivitu proti agregácii krvných doštičiek indukovanú kolagénom (10 µg/ml). Výsledky antiagregačnej aktivity niektorých izolátov poukazujú, že alkaloidy **1** a **2** vykazovali inhibičnú aktivitu na agregáciu krvných doštičiek indukovanú AA (100 µM) a kolagénom (10 µg/ml). Chinolínový alkaloid **3** vykazoval najsilnejšiu antiagregačnú aktivitu proti krvným doštičkám a to 71,2% a 72,6% inhibíciu agregácie trombocytov indukovanou AA a kolagénom pri 5 µg/ml a 20 µg/ml v danom poradí <sup>99</sup>.



graveolin

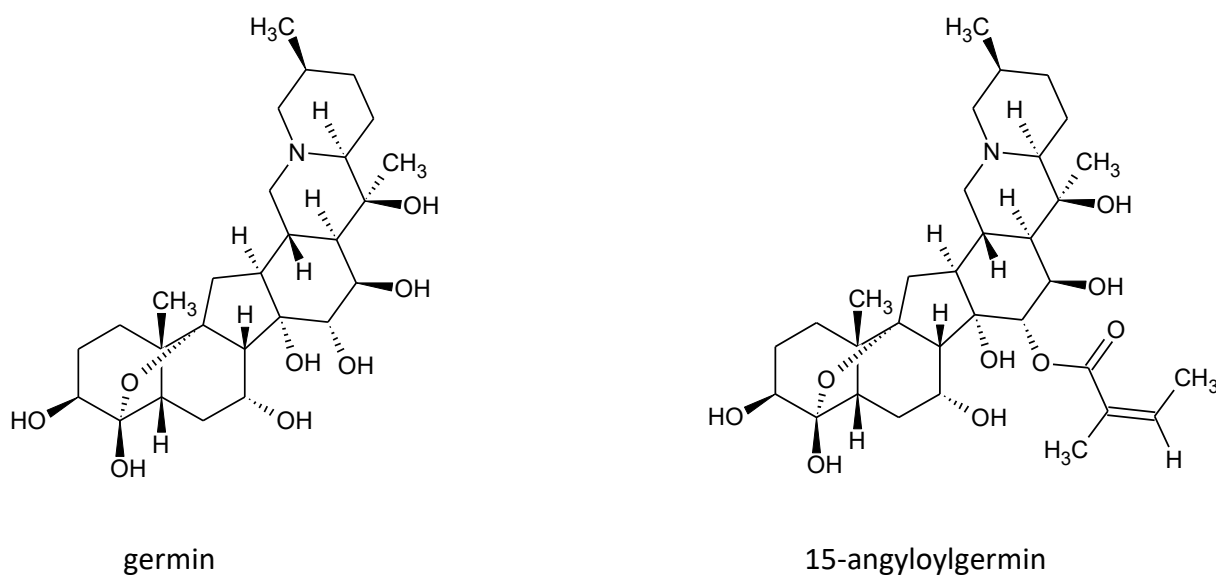
**Obr.31 Štruktúra chinolínového alkaloidu**

### 3.5.3. Alkaloidy vznikajúce transaminačnými reakciami – pseudoalkaloidy

Jedná sa o heterogénnu skupinu pseudoalkaloidov, kde sa v ich štruktúre dusík inkorporuje reakciou karbonylovej zlúčeniny spolu so zlúčeninou ako sú napríklad aminokyseliny, ktorá je zdrojom dusíka ale vo výslednej štruktúre sa nenachádza <sup>71</sup>.

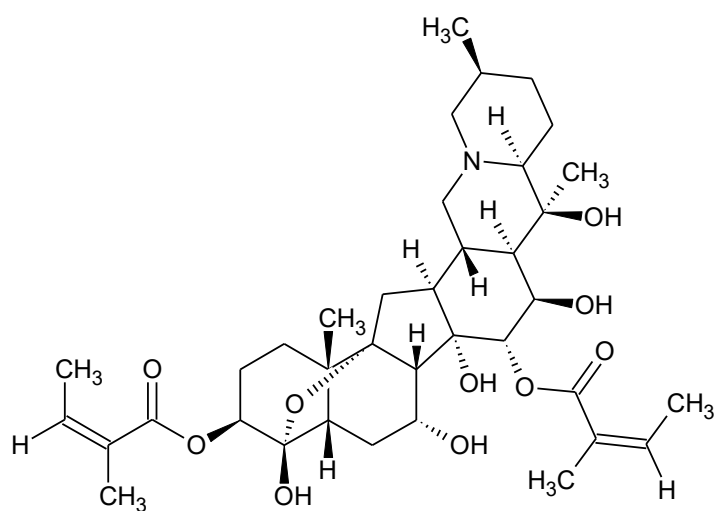
#### 3.5.3.1. Steroidné alkaloidy

Atóm dusíka sa môže vyskytovať vo výslednej štruktúre v postrannom reťazci ako aminoskupina, prípadne môže tvoriť heterocyklus.<sup>71</sup> Majú cyklopentanoperhydro-fenanthrénový skelet. Ich štruktúry sa odvodzujú od cholestanu alebo pregnanu.<sup>66</sup> Medzi predstaviteľov steroidných alkaloidov, ktoré vykazujú antiagregačné účinky patrí *Veratrum dahuricum* (Turcz.) O. Loes. z čeľade Melanthiaceae. V tradičnej čínskej medicíne sa používa pri niektorých ochoreniach, napríklad pri epilepsii. Alkaloidy majú významné antiadhézne, antikoagulačné a protidoštičkové účinky, čo by mohlo byť prospešné pri liečbe. Vykazujú okrem iného aj významný protinádorový účinok, ktorý vychádza z inhibície dráhy Hedgehog (Hh). V štúdiu sa popisuje izolácia 10 steroidných alkaloidov: cyklopamin (1), veratramin (2), jervin (3), 3,15-diangyloylgermine (4), 3-angyloylzygadenin (5), 3-veratroylzygadenin (6), 15-angyloylgermin (7), germin (8), veratrosin (9), pseudojervin (10) a hodnotí sa ich protidoštičkový účinok. Alkaloidy sú rozdelené do dvoch skupín: skupina jerveratrum (1, 2, 3, 9 a 10) a skupina ceveratrum (4, 5, 6, 7 a 8) <sup>100</sup>.

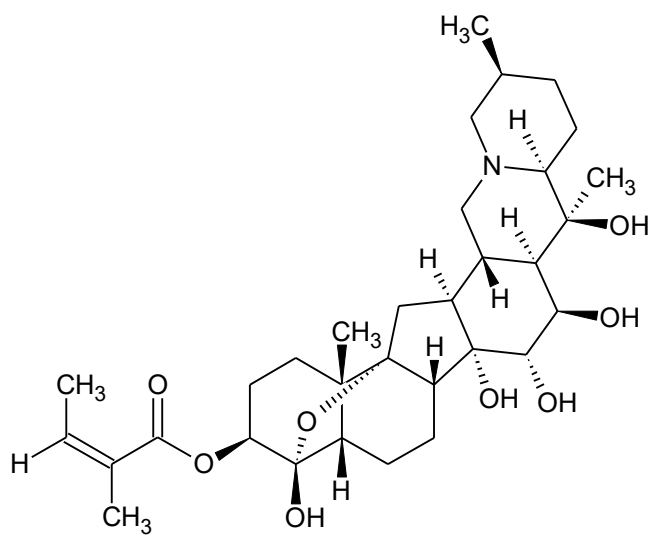


Obr.32 Štruktúry steroidných alkaloidov rastliny *Veratrum dahuricum*



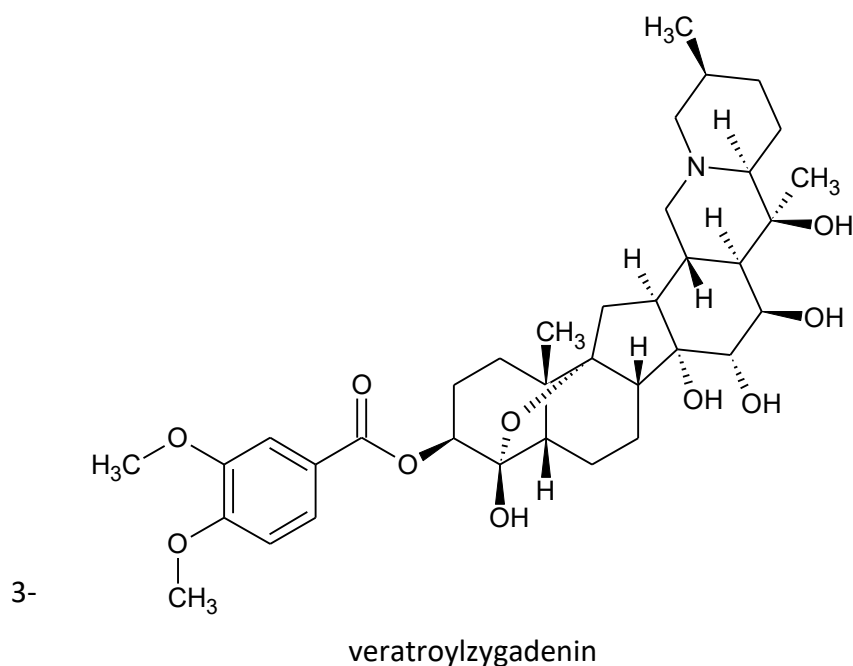


3,15-di-angyloylgermin



3-angyloylzygadenin

Obr.32 Štruktúry steroidných alkaloidov rastliny *Veratrum dahuricum* (pokračovanie)



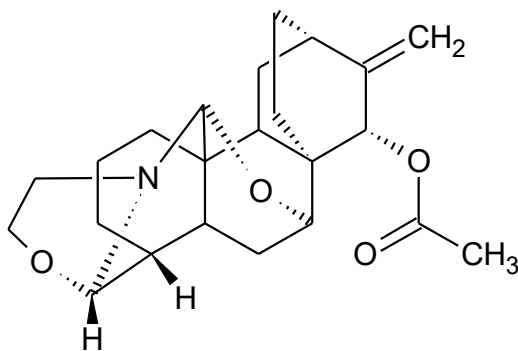
**Obr.32 Štruktúry steroidných alkaloidov rastliny *Veratrum dahuricum* (pokračovanie)**

V protidoštičkovom teste bola agregácia indukovaná AA, ADP a PAF. Zistilo sa, že zlúčenina **7** spôsobuje najsilnejšiu inhibíciu proti agregácii krvných doštičiek indukovanou AA, s mierou inhibície 92,0 % pri 100  $\mu\text{M}$ . Zistilo sa, že pri koncentrácii vzoriek 1000  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$  zlúčeniny **1**, **2**, **3**, **9** a **10** vykazovali slabú inhibičnú aktivitu proti agregácii krvných doštičiek, pričom väčšina inhibičných koncentrácií bola nižšia ako 50 % pri koncentrácii 1 000  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ , s tou výnimkou, že zlúčenina **3** poskytla mieru inhibície 92,7 % proti agregácii krvných doštičiek indukovanou AA pri 1000  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ . Zlúčeniny **4**, **5**, **6**, **7** a **8** vykazovali na testovaných vzorkách krvi viditeľnú, rôznu inhibičnú aktivitu. V porovnaní s PAF a ADP bola inhibícia ceveratrumových alkaloidov na agregáciu trombocytov indukovaných AA signifikantnejšia s tou výnimkou, že zlúčenina **4** vykazovala vyššiu inhibíciu (73,6 % pri 500  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) proti agregácii trombocytov indukovanou PAF ako pri agregácii indukovanou AA (60,4 % pri 500  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ). Zlúčenina **7** vykázala najvyšší inhibičný účinok (100% pri 200  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ; 95,4% pri 100  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ; 35,6% pri 50  $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ ) na kultivačnom médiu s AA, ale nebola citlivá na ostatné dve krvné média s ADP a PAF. Ceveratrumové alkaloidy (**4**, **5**, **6**, **7** a **8**) boli citlivejšie na agregáciu krvných doštičiek indukovanú AA, PAF a ADP <sup>100</sup>.

Je teda možné, že ceveratrumové alkaloidy sú hlavnými aktívnymi zložkami, ktoré vedú k pozoruhodným antiadhezívnym, antikoagulačným a protidoštičkovým aktivitám <sup>100</sup>.

### 3.5.3.2. Terpénové alkaloidy

Najpočetnejšou skupinou sú diterpénické alkaloidy, ktoré môžeme rozdeliť do 3 skupín na základe počtu uhlíkov v terpénovej štruktúre: C18-, C19- a C-20 deriváty.<sup>71</sup> Diterpénové alkaloidy s C-19 štruktúrou boli rozsiahlo študované a preskúmané z hľadiska ich protizápalových, antiarytmických, protiplesňových a analgetických účinkov. Na rozdiel od toho existuje len málo informácií o farmakologických aktivitách diterpénových alkaloidov s C-20 kostrou. Šesť diterpénových alkaloidov s C-20 skeletom atizínového typu, izolovaných z čínskych rastlín *Spiraea japonica* L.f. z čeľade Rosaceae, ako aj osem derivátov spiraminu C (**1**) a spiradinu F (**2**) sa hodnotili z hľadiska ich schopnosti inhibovať agregáciu králičích doštičiek indukovaných AA, ADP a PAF. Alkaloidy atizínového typu zo *S. japonica* selektívne inhibovalo agregáciu trombocytov indukovanou PAF. Inhibičný účinok bol menej účinný ako účinok ginkgolidu B, ktorý je jedným zo známych antagonistov receptora PAF. Tieto inhibičné účinky však boli špecifické pre PAF a nemali žiadny vplyv na agregáciu indukovanou AA a ADP, ako má ginkgolid B. To naznačuje, že alkaloidy atizínového typu môžu byť novou triedou antagonistov receptora PAF <sup>101</sup>.



spiramin

**Obr.33 Štruktúra terpénového alkaloidu**

Zlúčeniny s oxazolidínovým kruhom, ako je napríklad zlúčenina **1** a spiradin F1, boli oveľa účinnejšie ako zlúčeniny s otvoreným oxazolidínovým kruhom. Toto zistenie ukázalo, že oxazolidínový kruh je dôležitý pre inhibičný účinok agregácie krvných doštičiek indukovanej PAF. Zistilo sa tiež, že alkaloidy atizínového typu so substitúciou kyslíka na C-15 boli aktívne, zatiaľ čo poloha substitúcie kyslíkom na C-6 viedla k výraznému zníženiu inhibičnej aktivity týchto zlúčenín. Spiramin A (**3**) s acetylovou skupinou na C-15 bol spomedzi týchto zlúčenín najúčinnjší a bol 20,7-krát účinnejší ako zlúčenina **2**. Výsledky ukázali, že účinnosť týchto zlúčenín bola úzko ovplyvnená substitúciou na C-15 čo naznačuje, že skupina na pozícii C-15 by mohla byť ďalším aktívnym centrom. Keď sa acetylová skupina zlúčeniny **3** oxidovala na keto skupinu vykazovala široké spektrum agregáčnej aktivity proti doštičkám. Inhibovala agregáciu krvných doštičiek závislú od koncentrácie, ktorá bola vyvolaná nielen PAF ale aj ADP a AA <sup>101</sup>.

## 4. DISKUSIA A ZÁVER

V mojej práci som sa venovala problematike hemostázy v spojitosti s AD. Podľa najnovších štúdií, ktoré sa zaoberajú touto témou prišli vedci k mnohým teóriám, hypotézam a mechanizmom ako môžu krvné doštičky, jednotlivé komponenty krvného zrážania prispievať v patofyziológii tohto ochorenia.

Vo viacerých štúdiách sa vedci domnievajú, že aktivovaný vnútorný koagulačný systém cestou aktivácie faktora XII vylučuje prozápalový mediátor bradykinín, ktorý aktivuje zápalové procesy v tele. Zároveň však tento aktivovaný faktor XIIa aktivuje FXI, čo vedie k tvorbe trombínu, následne premene fibrinogénu na fibrín a tvorbe zrazenín. Podľa štúdií sa zdá, že práve A $\beta$  môže podporovať tvorbu trombínu prostredníctvom aktivácie FXII. Vedci veria, že by blokovanie aktivácie vnútorného koagulačného systému mohlo priniesť úspech v terapii AD.

Ďalším perspektívnym terapeutickým cieľom je hlavný receptor adhézie doštičiek, integrín  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ktorý sa viaže na monomérny A $\beta$ , čo v konečnom dôsledku vedie k uvoľneniu klastínu a ADP z aktivovaných krvných doštičiek. Uvoľňovanie klastínu hrá dôležitú úlohu pri uľahčovaní agregácie A $\beta$  fibríl a teda patogenéze AD. V predklinickom vývoji je už rekombinantná protilátka scFv, ktorá sa zameriava len na aktivovaný  $\alpha_{IIb}\beta_3$  a tým sa eliminuje zvýšené riziko krvácania.

Proces patofyziológie AD v spojitosti s hemostázou je komplexný a podieľa sa na nej množstvo faktorov. Veľmi dobrým znázornením procesu tvorby doštičkových zrazenín a amyloidných plakov je na obr.6 na str. 49, ktorý nám hovorí, že zápalové bunky môžu interagovať s krvnými doštičkami, ktoré sprostredkujú ich adhéziu na stenu ciev. Krvné doštičky sú hlavným zdrojom prozápalových chemokínov a cytokínov. Vzájomné pôsobenie krvných doštičiek, leukocytov a mozgového endotelu môže modulovať toto ochorenie.

V mojej ďalšej kapitole som sa venovala alkaloidom. Alkaloidy tvoria rozsiahlu a významnú skupinu látok. Zamerala som sa na tú skupinu alkaloidov, ktoré majú určitým spôsobom potenciál inhibovať agregáciu krvných doštičiek, čo by sa mohlo v praxi následne využiť. Z dostupnej vedeckej literatúry, ktorú som použila vedci vo svojich štúdiách testovali

antiagregačnú aktivitu alkaloidov a porovnávali ich efekt na základne referenčnej kontroly, ktorou bola ASA. Na vyvolanie procesu agregácie sa používali induktory ako trombín, kolagén, ADP, AA, U46619.

Možnými mechanizmami účinku výsledkom, ktorej je inhibícia agregácie je ovplyvnenie syntézy  $\text{TxA}_2$ , inhibícia PLCG2, inhibícia proteínovej tyrozínovej fosforylácie. Ďalším významným mechanizmom účinku, ktorý je typický pre *Sanguinaria canadensis* L. je ovplyvnenie dráhy PPAR a inhibície exprese P-selektínu. Alkaloid získaný z tejto rastliny aktivuje adenylátcyklázu, následne produkciu cAMP, inhibuje uvoľňovanie  $\text{Ca}^{2+}$  iónov a produkciu  $\text{TxA}_2$ .

Významnou skupinou inhibítorov agregácie sú karbazolové alkaloidy z rodu *Murraya* čelade Rutaceae, ktoré okrem antiagregačných účinkov vykazujú aj účinky protizápalové a antioxidačné. Významným zástupcom je girinimbín, ktorý priamo inhibuje aktivitu COX, zvyšuje hladinu cAMP a inhibuje tvorbu  $\text{PGD}_2$ .

Pre štúdium perspektívnou skupinou sú aj isochinolínové alkaloidy a ich podskupina aporfínov. Patria medzi inhibítory AChE, sú ligandmi receptorov pre centrálny nervový systém, látkami proti AD a silnými agonistami dopamínu D1/D2. Prírodné a polosynetické aporfíny vykazujú antioxidačné a protidoštičkové účinky. V mojej práci uvádzam významných zástupcov z čeladi Lauraceae, Magnoliaceae, Piperaceae, Papaveraceae a Anonaceae. *Corydalis yanhusuo* (Y.H. Chou & Chun C. Hsu) W.T. Wang ex Z.Y. Su & C.Y. Wu z čelade Papaveraceae je antioxidantom a zároveň môže zvýšiť hladinu cAMP doštičiek a tým môže inhibovať uvoľňovanie ADP.

Pyrrolidinoindolínový alkaloid Psm2 zo *Selaginella moellendorffii* Hieron funguje ako inhibítor PI3K v krvných doštičkách a tým bráni aktivácii receptora GPIIb/IIIa, čo vedie k inhibícii agregácie krvných doštičiek. PI3K $\beta$  hrá významnú úlohu pri regulácii aktivácie a adhézii receptora GPIIb/IIIa, čo je potrebné pre šírenie doštičiek a trvalú agregáciu doštičiek. Psm2 môže interagovať s PI3K vytváraním vodíkových väzieb. Má antitrombotický účinok a vyššiu účinnosť ako ASA, čím môže byť sľubným antiagregačným kandidátom. Jeho výhodnou vlastnosťou je aj nižšie riziko krvácania ako u ASA.

Ďalšou sľubnou skupinou alkaloidov sú indolopyridochinazolinové alkaloidy z čeľade Rutaceae. Hlavnou obsahovou látkou je rutakarpin, ktorý vykazuje antiagregačné účinky inhibíciou tvorby  $\text{TxA}_2$  a rozkladom fosfoinozítidov. Rod *Evodia* zároveň vykazuje silnú inhibičnú aktivitu proti AChE a BChE so selektivitou k AChE. Ďalšie štrukturálne modifikácie tohto alkaloidu viedli k dramatickému zvýšeniu aktivity proti AChE a k selektivitě AChE.

Skupina  $\beta$ -karbolínových alkaloidov selektívne inhibovala PLCG2, potlačovala mobilizáciu cytosolických  $\text{Ca}^{2+}$  iónov a potlačovala uvoľňovanie AA. Najznámejší zástupcovia z tejto skupiny, harman, harmin a harmalin, majú silný potenciál vyvinúť sa ako nové antiagregancia. Ich ďalšími významnými vlastnosťami sú antidepresívne a antioxidačné účinky. Majú schopnosť inhibovať AChE a myeloperoxidázu. Avšak jeho nadmerná expresia sa podieľa aj na závažnom tremorogénnom účinku. Taktiež sú silnými inhibítormi MAO (zvyšujú hladinu biogénnych amínov). Potencionálne použitie harmalinu a harminu v terapii AD limitujú ich halucinogénne účinky, ostatné harmalové alkaloidy sú nehalucinogénne. Ich intoxikácia sa môže prejaviť zvracaním, agresivitou, potením a halucináciami <sup>102</sup>. Môžu však poslúžiť ako farmakofores pre vývoj (polo)syntetických derivátov.

Spomedzi chinolínových alkaloidov mali najväčší inhibičný potenciál na agregáciu *Melicope semecarpifolia* (Merr.) T.G. Hartley a *Ruta graveolens* L. voči viacerým induktorm.

K pozoruhodným antiadhezívnym, antikoagulačným a protidoštičkovým aktivitám patria aj alkaloidy z rastliny *Veratrum dahuricum* (Turcz.) O. Loes z čeľade Liliaceae. Alkaloid 15-angyloylgermin vykazoval vysokú antiagregačnú aktivitu najmä voči AA. Zdá sa, že ceveratrumové alkaloidy sú hlavnými aktívnymi zložkami, ktoré vedú k pozoruhodným antiadhezívnym, antikoagulačným a protidoštičkovým aktivitám. Alkaloidy pochádzajúce z tejto rastliny však vykazujú značnú toxicitu. V štúdiu uvedené alkaloidy, cyklopamin a jervin (jerveratrumové alkaloidy), sú silné teratogény a spôsobujú malformácie typu kyklopií u plodu. Germin (ceveratrumový alkaloid) vykazuje kardiotoxické účinky, spôsobuje arytmiu a má silný emetogénny účinok <sup>102</sup>.

Potencionálne liečivá s antiagregačnou aktivitou by nemali byť toxické. Aj keď steroidné alkaloidy vykazovali potenciónný efekt na inhibíciu agregácie krvných doštičiek ich rizikom, ktorým je GIT toxicita je pre terapiu nevhodná. Rovnako tak alkaloidy rastliny

*Veratrum dahuricum* (Turcz.) O. Loes, kde za prospektívne antiagregačné látky sa považujú ceveratrumové alkaloidy, sú z hľadiska terapie nevhodné nakoľko sú kardiotoxické. Harmalové alkaloidy, ktoré vykazovali v štúdiách inhibičný efekt na agregáciu trombocytov sú z hľadiska vyššie popísanej toxicity nevhodné. U rastlín ako je napríklad *Corydalis tashiroi* Makino, *Evodia rutaecarpa* C.C. Huang, *Ruta graveolens* L. boli popísané cytotoxické účinky. Uvedené látky však môžu poslúžiť ako predlohy pre prípravu bezpečnejších semisyntetických derivátov

V závere možno zhrnúť, že vybrané alkaloidné druhy rastlín sa javia pre terapiu AD prospešné nielen vďaka ich antiagregačnej aktivite, ale aj vďaka komplexnejšiemu účinku pre AD pacienta, nakoľko niektoré z nich vykazujú inhibičnú aktivitu voči AChE, BChE. K prídavným účinkom možno zahrnúť aj ich antioxidačné a protizápalové účinky. Ich prínos a účinky v terapii AD je potrebné však naďalej preskúmať.



## 5. ABSTRAKT

Muchová, A.: Antiagregačná aktivita alkaloidov a jej potencionálne využitie v terapii Alzheimerovej choroby. Diplomová práca, Univerzita Karlova v Prahe, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutickej botaniky, Hradec Králové, 2020.

Na patofyziológii Alzheimerovej choroby, ako neurodegeneratívneho ochorenia sa podľa najnovších štúdií podieľajú trombocyty a s nimi spojená porucha hemostázy, uvoľňovanie zápalových buniek, čo môže vyústiť k uľahčovaniu tvorby amyloidných plakov.

Alkaloidy ako dusíkaté látky zásaditého charakteru, majú mnoho účinkov na ľudí či zvieratá. V spojitosti s touto problematikou, vedci skúmajú antiagregačný efekt mnohých štruktúrnych typov alkaloidov. Pre štúdium perspektívne sú isochinolínové alkaloidy z čeľadí Lauraceae, Annonaceae, Piperaceae, Magnoliaceae a Papaveraceae. Mimo antiagregačných účinkov majú zároveň antioxidačný a inhibičný efekt na acetylcholinesterázu, čo sa taktiež využíva v terapii Alzheimerovej choroby.

Ďalšou sľubnou látkou je pyrrolidinoindolínový alkaloid Psm2, ktorý sa získal z rastliny *Selaginella moellendorffii* Hieron. Má antiagregačný efekt vyšší ako referenčná látka kyselina acetylsalicylová a zároveň je spojený s nižším rizikom krvácania. Dôležitých zástupcov antiagregačnej aktivity nájdeme aj v  $\beta$ -karbolínových a karbazolových alkaloidoch.

Táto práca je literárnou rešeršou, ktorej úlohou bolo sumárne spracovať z dostupných literárnych zdrojov do budúca perspektívne alkaloidy s antiagregačnou úlohou.

**Kľúčové slová:** Alzheimerova choroba, alkaloidy, antiagregačná aktivita, trombocyty

## 6. ABSTRACT

Muchová, A.: Antiplatelet activity of alkaloids and its potential use in the Alzheimer's disease therapy. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2020.

According to recent studies, the pathophysiology of Alzheimer's disease, as a neurodegenerative disease, has been implicated in platelets and the associated haemostasis disorder, the release of inflammatory cells, which may result in the facilitation of amyloid plaque formation.

Alkaloids as alkaline nitrogen compounds, which have many effects on humans or animals. In connection with this issue, researchers are investigating the antiplatelet effect of many structural types of alkaloids.

The isoquinoline alkaloids of the families Lauraceae, Annonaceae, Piperaceae, Magnoliaceae and Papaveraceae are perspective for the study. In addition to their antiplatelet effects, they also have an antioxidant and inhibitory effect on acetylcholinesterase, which is also used in Alzheimer's disease therapy.

Another promising substance is the pyrrolidinoindoline alkaloid Psm2, which was isolated from the plant *Selaginella moellendorffii* Hieron. It has an antiplatelet effect higher than the reference substance acetylsalicylic acid and is also associated with a lower risk of bleeding. Important representatives of antiplatelet activity are also found in  $\beta$ -carboline and carbazole alkaloids.

This work is a literary research, whose task was to summarize from available literary sources into perspective prospective alkaloids with antiplatelet role.

**Key words:** Alzheimer's disease, alkaloids, antiplatelet activity, platelets

## 7. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Jelic V, Hagman G, Yamamoto NG, et al. Abnormal platelet amyloid- $\beta$  protein precursor (A $\beta$ PP) metabolism in Alzheimer's disease: identification and characterization of a new A $\beta$ PP isoform as potential biomarker. *J Alzheimers Dis.* 2013;35(2):285-295. ISSN: 1875-8908.
2. Zvěřová M. *Alzheimerova Demence*. Vydání 1. Praha: Grada Publishing 2017. ISBN: 978-80-271-0561-8.
3. Gowert NS, Donner L, Chatterjee M, et al. Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2014;9(2). ISSN: 1932-6203.
4. McFadyen J, Peter K. Forget about thrombosis: Platelets and Alzheimer's disease, yet another sticky situation. *Sci Signal*. 2016;9(429): 1-3. ISSN: 1945-0877, 1937-9145
5. Bulvová L. Alkaloidy Papaver rhoeas L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě I. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha 2017.
6. Sakalová A, ed. *Klinická Hematologie*. Martin: Osveta 2010. ISBN: 978-80-8063-324-0.
7. Kanchan M. Ganda M.D. Primary and secondary hemostasis: Normal mechanisms, disease states, and coagulation tests: Assessment, analysis, and associated dental management guidelines. John Wiley & Sons, Ltd, New Jersey, USA 2017; 229-242. ISBN: 978-1-119-42145-0.
8. Trojan S. *Lékařská Fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada 2003. ISBN: 978-80-247-0512-5.
9. Austin, Steven K. Haemostasis. *Medicine*. 2017;45(4):204-208. ISSN: 1357-3039.
10. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515-523. ISSN: 0019-5049.

11. Blanco A, Blanco G. Chapter 31 - Hemostasis. *Medical Biochemistry*. Academic Press; 2017:781-789. ISBN: 978-0-12-803550-4.
12. Penka M, Slavíčková E. *Hematologie a transfúzní lékařství. I: Hematologie*. 1. vyd. Praha: Grada 2011. ISBN: 978-80-247-3459-0.
13. Wilson MR, Campbell Tait R. Chapter 23 - Hemostasis and Anticoagulants. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. San Diego: Academic Press; 2014:479-496. ISBN: 978-0-12-386882-4.
14. <http://eclinpath.com/hemostasis/physiology/secondary-hemostasis/secondary-haemostasis/>, stiahnuté 28.1.2020.
15. Váleková Ľ. Klinika hematológie a transfúziológie, Via Practica, SOLEN, Bratislava 2005; 2 (7-8): 311-315. ISSN: 1339-424X.
16. Penka M, Buliková A. *Neonkologická Hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada 2009. ISBN: 978-80-247-2299-3.
17. Maiese K. A novel prescription for Alzheimer's disease: targeting hypercoagulable states. *Curr Neurovasc Res*. 2015;12(1):1-3. ISSN: 1875-5739.
18. Canobbio I, Visconte C, Oliviero B, et al. Increased platelet adhesion and thrombus formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Signal*. 2016;28(12):1863-1871. ISSN: 1873-3913.
19. Stellos K, Katsiki N, Tatsidou P, Bigalke B, Laske C. Association of platelet activation with vascular cognitive impairment: implications in dementia development? *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12(1):152-154. ISSN: 1875-6212.
20. Guľášová I. ALZHEIMEROVA CHOROBA - RIZIKOVÉ A PROTEKTÍVNE FAKTORY. Bratislava 2011; 13(4): 484-489.

21. Borroni B, Volpi R, Martini G, et al. Peripheral blood abnormalities in Alzheimer disease: evidence for early endothelial dysfunction. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2002;16(3):150-155. ISSN: 0893-0341.
22. Cortes-Canteli M, Paul J, Norris EH, et al. Fibrinogen and beta-amyloid association alters thrombosis and fibrinolysis: a possible contributing factor to Alzheimer's disease. *Neuron.* 2010;66(5):695-709. ISSN: 1097-4199.
23. Rogers J. The inflammatory response in Alzheimer's disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1535-1543. ISSN: 0022-3492.
24. Hort J., Glosová L., Vyhnálek M., Bojar M., Škoda D., Hladíková M. Tau protein a beta amyloid v likvoru u Alzheimerovy choroby a normy odvozené od kognitivně zdravých kontrol. *Cesk a Slov Neurol. Ambit Media, Praha* 2007; 70/103(1): 30-36. ISSN: 1802-4041.
25. Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, et al. Release of beta-amyloid from high-density platelets: implications for Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1096:170-178. ISSN: 0077-8923.
26. Bartko D, Čombor I, Madarász Š, Luliak M. DEMENCIA ALZHEIMEROVHO TYPU. *Via Practica.* SOLEN, Bratislava 2008; 10: 398-402. ISSN: 2008:1339-424X.
27. Žigová E. LIEČBA ALZHEIMEROVEJ DEMENCIE MEMANTÍNOM. *Psychiatrie pro praxi.* SOLEN, Bratislava 2006; 6: 291-294. ISSN: 1803-5272.
28. Sevush S, Jy W, Horstman LL, Mao WW, Kolodny L, Ahn YS. Platelet activation in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1998;55(4):530-536. ISSN: 0003-9942.
29. Canobbio I, Guidetti GF, Oliviero B, et al. Amyloid  $\beta$ -peptide-dependent activation of human platelets: essential role for  $\text{Ca}^{2+}$  and ADP in aggregation and thrombus formation. *Biochem J.* 2014;462(3):513-523. ISSN: 1470-8728.
30. Strickland S. Blood will out: vascular contributions to Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 2018;128(2):556-563. ISSN: 1558-8238.

31. Jarre A, Gowert NS, Donner L, et al. Pre-activated blood platelets and a pro-thrombotic phenotype in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *Cell Signal*. 2014;26(9):2040-2050. ISSN: 1873-3913.
32. Zamolodchikov D, Strickland S. A possible new role for A $\beta$  in vascular and inflammatory dysfunction in Alzheimer's disease. *Thromb Res*. 2016;141 Suppl 2:S59-61. ISSN: 1879-2472.
33. Zamolodchikov D, Renné T, Strickland S. The Alzheimer's disease peptide  $\beta$ -amyloid promotes thrombin generation through activation of coagulation factor XII. *J Thromb Haemost*. 2016;14(5):995-1007. ISSN: 1538-7836.
34. McFadyen J, Peter K. Forget about thrombosis: Platelets and Alzheimer's disease, yet another sticky situation. *Sci Signal*. 2016;9(429):1-3. ISSN: 1945-0877, 1937-9145.
35. Cortes-Canteli M, Zamolodchikov D, Ahn HJ, Strickland S, Norris EH. Fibrinogen and altered hemostasis in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;32(3):599-608. ISSN: 1875-8908.
36. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):43-62. ISSN: 1863-2300.
37. Burrell M, Henderson SJ, Ravnefjord A, et al. Neprilysin Inhibits Coagulation through Proteolytic Inactivation of Fibrinogen. *PLoS One*. 2016;11(7). ISSN: 1932-6203.
38. Mancuso ME, Santagostino E. Platelets: much more than bricks in a breached wall. *Br J Haematol*. 2017;178(2):209-219. ISSN: 1365-2141.
39. Wang R, Jin D, Li Y, Liang Q. Decreased mean platelet volume and platelet distribution width are associated with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*. 2013;47(5):644-649. ISSN: 1879-1379.
40. Cibičková Ľ, Palička V. Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E – nové souvislosti. *Klinická biochemie a metabolismus*, Pardubice 2005; 3:127-130. ISSN: 1210-7921.

41. Laske C, Sopova K, Stellos K. Platelet activation in Alzheimer's disease: from pathophysiology to clinical value. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(5):626-630. ISSN: 1875-6212.
42. Sepúlveda C, Hernández B, Burgos CF, Fuentes E, Palomo I, Alarcón M. The cAMP/PKA Pathway Inhibits Beta-amyloid Peptide Release from Human Platelets. *Neuroscience*. 2019;397:159-171. ISSN: 1873-7544.
43. Vlček J, Fialová D. *Klinická Farmacie I*. 1. vyd. Praha: Grada 2010. ISBN: 978-80-247-3169-8.
44. Ambler Z. *Základy neurologie*. vyd. Praha: Galén 2011. ISBN:978-80-7262-707-3.
45. Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*, Praha 2009; 5:342-345. ISSN:2336-3541.
46. Martínková J, ed. *Farmakologie pro Studenty Zdravotnických Oborů*. 1. vyd. Praha: Grada 2007. ISBN: 978-80-247-1356-4.
47. Čakurdová M. Alkaloidy *Papaver rhoeas* L. (Papaveraceae) a jejich biologická aktivita vztažená k Alzheimerově chorobě II. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha 2017.
48. Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Wirth J, Wenke M. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Praha: Grada 2012. ISBN: 978-80-247-3908-3.
49. Vítovec J, Špinar J, Špinarová L. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. 3., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada 2017. ISBN: 978-80-247-4713-2.
50. Dite P, Novotný I, Penka M. Nesteroidní antiflogistika, antikoagulanční, antiagreganční a změny sliznice žaludku a dvanáctníku. *Internal Medicine for Practice*. 2008;10(9):384-386. ISSN: 12127299.
51. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/klasifikacia/HLB01AC06/kyselina-acetylsalicylova>, stiahnuté 20.1.2020.

52. Wijeyeratne YD, Heptinstall S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;72(4):647-657. ISSN: 0306-5251.
53. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/klasifikacia/HLB01AC04/klopido-grel>, stiahnuté 20.1.2020.
54. Minárik P, Mináriková M, Hoppan M. Nové perspektívne antiagreganciá pre klinickú prax. *Vask med*. 2012;4(1-2):25-27. ISSN: 13394266.
55. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/klasifikacia/HLB01AC22/prasugrel>, stiahnuté 20.1.2020.
56. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/klasifikacia/HLB01AC24/tikagrelor>, stiahnuté 20.1.2020.
57. Vojáček J. Inhibitory destičkových glykoproteinových receptoru typu IIb/IIIa. *Remedia*, Praha 2003; 2:84-92. ISSN:23363541.
58. Aschermann M, Linhart A, Řezníček V, Nováčková K. Použití inhibitorů destičkových glykoproteinových receptorů IIb/IIIa v kardiologii. *Interní medicína pro praxi*. 2005;3(6):250-254. ISSN: 12127299, 18035256.
59. <https://www.adc.sk/databazy/produkty/klasifikacia/HLB01AC/antiagregancia-trombocytov-okrem-heparinu>, stiahnuté 20.1.2020.
60. Bedenis R, Stewart M, Cleanthis M, Robless P, Mikhailidis DP, Stansby G. Cilostazol for intermittent claudication. Cochrane Vascular Group, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. October 2014. ISSN: 14651858
61. Bhana N, McClellan KJ. Indobufen: an updated review of its use in the management of atherothrombosis. *Drugs Aging*. 2001;18(5):369-388. ISSN: 1170-229X.



62. Kleemann E, Schmehl T, Gessler T, Bakowsky U, Kissel T, Seeger W. Iloprost-containing liposomes for aerosol application in pulmonary arterial hypertension: formulation aspects and stability. *Pharm Res.* 2007;24(2):277-287. ISSN: 0724-8741.
63. Skoro-Sajer N, Lang I, Naeije R. Treprostinil for pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(3):507-513. ISSN: 1176-6344.
64. Ain Q-U-, Khan H, Mubarak MS, Pervaiz A. Plant Alkaloids as Antiplatelet Agent: Drugs of the Future in the Light of Recent Developments. *Front Pharmacol.* 2016;7:292. ISSN: 1663-9812.
65. Fuentes E, Palomo I. Relationship between Platelet PPARs, cAMP Levels, and P-Selectin Expression: Antiplatelet Activity of Natural Products. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:861786. ISSN: 1741-427X.
66. Spilková J. Univerzita K. *Farmakognozie*. Vydání první. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum 2016. ISBN: 978-80-246-3264-3.
67. Chen KS, Ko FN, Teng CM, Wu YC. Antiplatelet of vasorelaxing actions of some benzyloisoquinoline and phenanthrene alkaloids. *J Nat Prod.* 1996;59(5):531-534. ISSN: 0163-3864.
68. Xia M-Y, Yang J, Zhang P-H, et al. Amides, Isoquinoline Alkaloids and Dipeptides from the Aerial Parts of Piper mullesua. *Nat Prod Bioprospect.* 2018;8(6):419-430. ISSN: 2192-2209.
69. Chia Y-C, Chang F-R, Wu C-C, Teng C-M, Chen K-S, Wu Y-C. Effect of isoquinoline alkaloids of different structural types on antiplatelet aggregation in vitro. *Planta Med.* 2006;72(13):1238-1241. ISSN: 0032-0943.
70. Zhang Q, Chen C, Wang F-Q, et al. Simultaneous screening and analysis of antiplatelet aggregation active alkaloids from Rhizoma Corydalis. *Pharm Biol.* 2016;54(12):3113-3120. ISSN: 1744-5116.

71. Nagy M, Mučaji P, Grančai D. *Farmakognózia: Biologicky Aktívne Rastlinné Metabolity a Ich Zdroje*. Vydanie: druhé, doplnené a opravené. Bratislava: Herba 2017. ISBN: 1860-7187.
72. Sharma V, Jaiswal PK, Kumar S, et al. Discovery of Aporphine Analogues as Potential Antiplatelet and Antioxidant Agents: Design, Synthesis, Structure-Activity Relationships, Biological Evaluations, and in silico Molecular Docking Studies. *ChemMedChem*. 2018;13(17):1817-1832. ISSN: 1860-7187.
73. Teng CM, Hsueh CM, Chang YL, Ko FN, Lee SS, Liu KC. Antiplatelet effects of some aporphine and phenanthrene alkaloids in rabbits and man. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49(7):706-711. ISSN: 0022-3573.
74. Jantan I, Raweh SM, Yasin YHM, Murad S. Antiplatelet activity of aporphine and phenanthrenoid alkaloids from *Aromadendron elegans* Blume. *Phytother Res*. 2006;20(6):493-496. ISSN: 0951-418X.
75. Qu W, Wu F-H, Li J, Liang J-Y. Alkaloids from *Houttuynia cordata* and Their Antiplatelet Aggregation Activities. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2011;9(6):425-428. ISSN: 1875-5364.
76. Pyo MK, Yun-Choi HS, Hong Y-J. Antiplatelet activities of aporphine alkaloids isolated from leaves of *Magnolia obovata*. *Planta Med*. 2003;69(3):267-269. ISSN: 0032-0943.
77. Chang FR, Chen CY, Wu PH, Kuo RY, Chang YC, Wu YC. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J Nat Prod*. 2000;63(6):746-748. ISSN: 0163-3864.
78. Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *J Nat Prod*. 1998;61(12):1457-1461. ISSN: 0163-3864.
79. Chen CY, Chang FR, Pan WB, Wu YC. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 2001;56(7):753-757. ISSN: 0031-9422.
80. Chia YC, Chen KS, Chang YL, Teng CM, Wu YC. Antiplatelet actions of aporphinoids from Formosan plants. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999;9(23):3295-3300. ISSN: 0960-894X.

81. Chen JJ, Chang YL, Teng CM, Lin WY, Chen YC, Chen IS. A new tetrahydroprotoberberine N-oxide alkaloid and anti-platelet aggregation constituents of *Corydalis tashiroi*. *Planta Med.* 2001;67(5):423-427. ISSN: 0032-0943.
82. Su X-L, Su W, Wang Y, Wang Y-H, Ming X, Kong Y. The pyrrolidinoindoline alkaloid Psm2 inhibits platelet aggregation and thrombus formation by affecting PI3K/Akt signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37(9):1208-1217. ISSN: 1745-7254.
83. Im J-H, Jin Y-R, Lee J-J, et al. Antiplatelet activity of beta-carboline alkaloids from *Perganum harmala*: a possible mechanism through inhibiting PLCgamma2 phosphorylation. *Vascul Pharmacol.* 2009;50(5-6):147-152. ISSN: 1879-3649.
84. Khan H, Patel S, Kamal MA. Pharmacological and Toxicological Profile of Harmane- $\beta$ -Carboline Alkaloid: Friend or Foe. *Curr Drug Metab.* 2017;18(9):853-857. ISSN: 1875-5453.
85. Ko FN, Lee YS, Wu TS, Teng CM. Inhibition of cyclooxygenase activity and increase in platelet cyclic AMP by girinimbine, isolated from *Murraya euchrestifolia*. *Biochem Pharmacol.* 1994;48(2):353-360. ISSN: 0006-2952.
86. Wu T-S, Chan Y-Y, Liou M-J, Lin F-W, Shi L-S, Chen K-T. Platelet aggregation inhibitor from *Murraya euchrestifolia*. *Phytotherapy Research.* 1998;12(S1):S80-S82. ISSN: 1099-1573.
87. Mohd Nor SM. Synthesis of N-Alkylated and N-Acylated Derivatives of Girinimbine. *Asian Journal of Chemistry.* 2017;29:801-804. ISSN: 0970-7077.
88. Wu TS, Huang SC, Wu PL, Teng CM. Carbazole alkaloids from *Clausena excavata* and their biological activity. *Phytochemistry.* 1996;43(1):133-140. ISSN: 0031-9422.
89. Wu TS, Huang SC. Clausine-D and -F, two new 4-prenylcarbazole alkaloids from *Clausena excavata*. *Chem Pharm Bull.* 1992;40(4):1069-1071. ISSN: 0009-2363.
90. Sheu JR, Kan YC, Hung WC, et al. The antiplatelet activity of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*, is mediated through inhibition of phospholipase C. *Thromb Res.* 1998;92(2):53-64. ISSN: 0049-3848.

91. Sheen WS, Tsai IL, Teng CM, Ko FN, Chen IS. Indolopyridoquinazoline alkaloids with antiplatelet aggregation activity from *Zanthoxylum integrifoliolum*. *Planta Med.* 1996;62(2):175-176. ISSN: 0032-0943.
92. Son J-K, Chang HW, Jahng Y. Progress in Studies on Rutaecarpine. II.--Synthesis and Structure-Biological Activity Relationships. *Molecules.* 2015;20(6):10800-10821. ISSN: 1420-3049.
93. Villar RM, Gil-Longo J, Daranas AH, et al. Evaluation of the effects of several zoanthamine-type alkaloids on the aggregation of human platelets. *Bioorg Med Chem.* 2003;11(10):2301-2306. ISSN: 0968-0896.
94. Chen I-S, Tsai I-W, Teng C-M, et al. Pyranoquinoline alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry.* 1997;46(3):525-529. ISSN: 0031-9422.
95. Ih-Sheng C, Shwu-Jen W, Yuh-Chwen L, et al. Dimeric 2-quinolone alkaloid and antiplatelet aggregation constituents of *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry.* 1994;36(1):237-239. ISSN: 0031-9422.
96. Chen J-J, Chang Y-L, Teng C-M, Su C-C, Chen I-S. Quinoline alkaloids and anti-platelet aggregation constituents from the leaves of *Melicope semecarpifolia*. *Planta Med.* 2002;68(9):790-793. ISSN: 0032-0943.
97. Chen KS, Chang YL, Teng CM, Chen CF, Wu YC. Furoquinolines with antiplatelet aggregation activity from leaves of *Melicope confusa*. *Planta Med.* 2000;66(1):80-81. ISSN: 0032-0943.
98. Chen IS, Chen HF, Cheng MJ, et al. Quinoline alkaloids and other constituents of *Melicope semecarpifolia* with antiplatelet aggregation activity. *J Nat Prod.* 2001;64(9):1143-1147. ISSN: 0163-3864.

99. Wu T-S, Shi L-S, Wang J-J, et al. Cytotoxic and Antiplatelet Aggregation Principles of *Ruta Graveolens*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2003;50(1):171-178. ISSN: 2192-6549.
100. Tang J, Li H-L, Shen Y-H, et al. Antitumor and antiplatelet activity of alkaloids from *veratrum dahuricum*. *Phytother Res*. 2010;24(6):821-826. ISSN: 1099-1573.
101. Li L, Shen Y-M, Yang X-S, et al. Antiplatelet aggregation activity of diterpene alkaloids from *Spiraea japonica*. *Eur J Pharmacol*. 2002;449(1-2):23-28. ISSN: 0014-2999.
102. Hrdina V. *Přírodní toxiny a jedy*. vyd. Praha: Galén 2004. ISBN: 978-80-7262-256-6